

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **11029410 A**

(43) Date of publication of application: **02 . 02 . 99**

(51) Int. Cl

A01N 37/06

(21) Application number: **09348678**

(22) Date of filing: **02 . 12 . 97**

(30) Priority: **04 . 03 . 97 JP 09 65553**
24 . 03 . 97 JP 09 88901
15 . 05 . 97 JP 09141077

(71) Applicant: **SHISEIDO CO LTD**

(72) Inventor: **YOKOYAMA MINEYUKI**
YAMAGUCHI SACHIKO
SAKAMOTO OKIHIKO
KOJIMA KIYOTAKA
FUKUI HIROSHI

(54) **FLOWER BUD FORMATION-INDUCING AGENT
AND FLOWER BUD FORMATION-INDUCING KIT**

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a flower bud formation-inducing agent directly acting on the flower bud formation of plants and a flower bud formation-inducing kit.

SOLUTION: The flower bud formation-inducing agent and the flower bud formation-inducing kit containing this

flower bud formation-inducing agent contain in principle, a ketol fatty acid in which one of the different two carbon atoms selected from the carbon atoms out from 2 to n-positions is the carbon atom constructing a carbonyl group and the other is the carbon atom linking to a hydroxy group and the number of the carbon atoms (n) of the ketol fatty acid is 424, as an active ingredient.

COPYRIGHT: (C)1999,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-29410

(43) 公開日 平成11年(1999) 2月2日

(51) Int.Cl.⁶
A 0 1 N 37/06

識別記号

F I
A 0 1 N 37/06

審査請求 未請求 請求項の数17 F D (全 24 頁)

(21) 出願番号	特願平9-348678	(71) 出願人	000001959 株式会社資生堂 東京都中央区銀座7丁目5番5号
(22) 出願日	平成9年(1997)12月2日	(72) 発明者	横山 峰幸 神奈川県横浜市港北区新羽町1050番地 株 式会社資生堂第1リサーチセンター内
(31) 優先権主張番号	特願平9-65553	(72) 発明者	山口 祥子 神奈川県横浜市港北区新羽町1050番地 株 式会社資生堂第1リサーチセンター内
(32) 優先日	平9(1997)3月4日	(72) 発明者	阪本 興彦 神奈川県横浜市港北区新羽町1050番地 株 式会社資生堂第1リサーチセンター内
(33) 優先権主張国	日本 (J P)	(74) 代理人	弁理士 志村 光春
(31) 優先権主張番号	特願平9-88901		
(32) 優先日	平9(1997)3月24日		
(33) 優先権主張国	日本 (J P)		
(31) 優先権主張番号	特願平9-141077		
(32) 優先日	平9(1997)5月15日		
(33) 優先権主張国	日本 (J P)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 花芽形成誘導剤及び花芽形成誘導用キット

(57) 【要約】

【課題】植物の花芽形成に直接作用する花芽形成誘導剤及び花芽形成誘導用キットを提供すること。

【解決手段】2位乃至n位のいずれかに位置する炭素原子から選ばれる異なる2つの炭素原子の一方がカルボニル基を構成する炭素原子であり、他方がヒドロキシル基が結合した炭素原子である、その炭素原子数であるnが4以上24以下であるケトール脂肪酸を原則として有効成分とする花芽形成誘導剤、及びこの花芽形成誘導剤を含む花芽形成誘導用キットを提供することにより、上記の課題を解決し得ることを見出した。なお、本願においてはかかる花芽形成誘導剤の有効成分の特定の製造方法も提供するものである。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 2 位乃至 n 位のいずれかに位置する炭素原子から選ばれる異なる 2 つの炭素原子の一方がカルボニル基を構成する炭素原子であり、他方がヒドロキシル基が結合した炭素原子である、その炭素原子数である n が 4 以上 24 以下であるケトール脂肪酸を有効成分とする花芽形成誘導剤。

【請求項 2】 請求項 1 記載の花芽形成誘導剤の有効成分であるケトール脂肪酸の、その 2 位乃至 n 位のいずれかに位置する炭素原子その炭素鎖におけるカルボニル基を構成する炭素原子及びヒドロキシル基が結合した炭素原子以外のいずれか 1 つの炭素原子がヒドロペルオキシ基が結合した炭素原子であるケトール脂肪酸を有効成分とする花芽形成誘導剤。

【請求項 3】 請求項 1 又は請求項 2 記載の花芽形成誘導剤の有効成分であるケトール脂肪酸の一方のカルボニル基を構成する炭素原子と、他方のヒドロキシル基が結合した炭素原子が α 位又は γ 位の位置にあるケトール脂肪酸を有効成分とする花芽形成誘導剤。

【請求項 4】 その炭素原子同士の結合形式に関し、2 重結合が 1 か所以上、6 か所以下存在する、請求項 1 乃至請求項 3 のいずれかの請求項記載の花芽形成誘導剤の有効成分であるケトール脂肪酸を有効成分とする花芽形成誘導剤。

【請求項 5】 その炭素原子数が 18 であり、かつその炭素原子同士の結合形式に関し、2 重結合が 2 か所存在する、請求項 1 乃至請求項 4 のいずれかの請求項記載の花芽形成誘導剤の有効成分であるケトール脂肪酸を有効成分とする花芽形成誘導剤。

【請求項 6】 2 位乃至 n 位のいずれかに位置する炭素原子がヒドロペルオキシ基が結合した炭素原子である、その炭素原子数である n が 4 以上 24 以下であるヒドロペルオキシ脂肪酸を有効成分とする花芽形成誘導剤。

【請求項 7】 請求項 1 乃至請求項 6 記載のいずれかの花芽形成誘導剤の有効成分であるケトール脂肪酸及び／又はヒドロペルオキシ脂肪酸、並びにノルエピネフリンを有効成分とする花芽形成誘導剤。

【請求項 8】 請求項 1 乃至請求項 6 記載のいずれかの花芽形成誘導剤の有効成分であるケトール脂肪酸及び／又はヒドロペルオキシ脂肪酸を含有する花芽形成誘導用キット。

【請求項 9】 請求項 1 乃至請求項 6 記載のいずれかの花芽形成誘導剤の有効成分であるケトール脂肪酸及び／又はヒドロペルオキシ脂肪酸、並びにノルエピネフリンを含有する花芽形成誘導用キット。

【請求項 10】 その炭素数が 4 以上 24 以下の不飽和脂肪酸に、リボキシゲナーゼを作用させてヒドロペルオキシ不飽和脂肪酸を製造する、請求項 6 記載の花芽形成誘導剤の有効成分であるヒドロペルオキシ脂肪酸の製造方法。

【請求項 11】 リボキシゲナーゼが、選択的にリノール酸の 9 位の二重結合部分を酸化するリボキシゲナーゼである、請求項 10 記載のヒドロペルオキシ脂肪酸の製造方法。

【請求項 12】 リボキシゲナーゼがコメ胚芽由来のリボキシゲナーゼである、請求項 11 記載のヒドロペルオキシ脂肪酸の製造方法。

【請求項 13】 不飽和脂肪酸がリノール酸又は α -リノレン酸である、請求項 10 乃至請求項 12 のいずれかの請求項記載のヒドロペルオキシ脂肪酸の製造方法。

【請求項 14】 その炭素数が 4 以上 24 以下の不飽和脂肪酸に、リボキシゲナーゼを作用させて得られたヒドロペルオキシ不飽和脂肪酸に、さらにアレンオキサイドシセンターゼを作用させて製造する、請求項 1 乃至請求項 5 記載のいずれかの花芽形成誘導剤の有効成分であるケトール脂肪酸の製造方法。

【請求項 15】 リボキシゲナーゼが、選択的にリノール酸の 9 位の二重結合部分を酸化するリボキシゲナーゼである、請求項 14 記載のヒドロペルオキシ脂肪酸の製造方法。

【請求項 16】 リボキシゲナーゼがコメ胚芽由来のリボキシゲナーゼである、請求項 15 記載のケトール脂肪酸の製造方法。

【請求項 17】 不飽和脂肪酸が、リノール酸又は α -リノレン酸である、請求項 14 乃至請求項 16 のいずれかの請求項記載のケトール脂肪酸の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、花芽形成誘導剤に関する技術分野の発明である。より詳細には、特定の構造のケトール脂肪酸、又はこのケトール脂肪酸とノルエピネフリンとを有効成分として含有する花芽形成誘導剤、並びに花芽形成誘導用キット、さらにはかかる特定の構造のケトール脂肪酸等の製造方法に関する発明である。

【0002】

【従来の技術】 植物の花成が日長によって支配されていることは、周知の通りである。そして、この日長に感応する部分は葉身であり、花成は生長点で起こり、葉身から葉柄や茎を通して生長点に何らかのシグナルが送られてこの花成が開始することが突き止められている。このシグナルは、フロリゲンと呼ばれており、これを分離・同定することができれば、日長に関わらず植物の開花時期を人為的に調節することが可能となり、植物が関わる多くの分野において多大な影響を与え得ることは明らかである。そこで、従来より植物の花成過程のメカニズムをより明らかにすることにより、開花時期を人為的に調節する試みがなされている。例えば、植物の生長ホルモンの一つであるジベレリンを施すと、多くの長日植物が短日下においても花芽を形成することやパインアップル

は合成オーキシンの一つである α -ナフトレン酢酸を施すと開花が起こることが突き止められ、現実に産業上利用されている。

【0003】しかしながら、これらの植物ホルモンは、いわばフロリゲン関連物質であり、フロリゲンそのものとは異なるであろうことも突き止められている。そのため、これらの植物ホルモンを植物に施す時期や環境等の様々な条件設定が必要であることが多く、さらなる開花手法の進歩、具体的には花芽形成に直接関わる物質を分離・同定して、この物質によって開花手法を確立することが望まれている。また、アサガオ属植物 (*Pharbitis*)、オナモミ属植物 (*Xanthium*) やドクムギ属植物 (*Lolium*) においては、光周性に基づく花成現象が、乾燥ストレスにより阻害されることが報告されている (アサガオ属及びオナモミ属について: Aspinall 1967 ; ドクムギ属について: King and Evans)。さらに、花芽誘導が低温 (Bernier et al. 1981 ; Hirai et al. 1994)、高照度 (Shinozaki 1972)、栄養養 (Hirai et al. 1993) や窒素源の不足 (Wada and Totuka 1982 ; Tanaka 1986 ; Tanaka et al. 1991) により惹起されることも既に報告されている。しかしながら、これらの報告は単に現象面を捉えたのみであって、上記フロリゲンを直接特定するには至っておらず、依然として物質面から捉えた開花方法の確立が望まれている。

【0004】

【発明が解決すべき課題】そこで、本発明が解決すべき課題は、開花に直接関わる花芽形成誘導物質等を見出して、この花芽形成誘導物質を有効成分とする花芽形成誘導手段を提供することである。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者は、上記課題の解決を目的として鋭意検討を行った。その結果、特定の構造を有するケトール脂肪酸が、単独で又はカテコールアミンの一種であるノルエビネフリンと組合せて作用させること等によって、所望する花芽形成誘導活性を植物に対して広く有すること等を見出し、本発明を完成した。すなわち本発明者は、本願において、以下の花芽形成誘導剤等を提供する。

【0006】請求項1において、2位乃至n位のいずれかに位置する炭素原子から選ばれる異なる2つの炭素原子の一方がカルボニル基を構成する炭素原子であり、他方がヒドロキシル基が結合した炭素原子である、その炭素原子数であるnが4以上24以下であるケトール脂肪酸を有効成分とする花芽形成誘導剤を提供する。

【0007】請求項2において、前記請求項1記載の花芽形成誘導剤の有効成分であるケトール脂肪酸の、その2位乃至n位のいずれかに位置する炭素原子その炭素鎖におけるカルボニル基を構成する炭素原子及びヒドロキシル基が結合した炭素原子以外のいずれか1つの炭素原子がヒドロペルオキシ基が結合した炭素原子であるケト

ール脂肪酸を有効成分とする花芽形成誘導剤を提供する。

【0008】請求項3において、前記請求項1又は請求項2記載の花芽形成誘導剤の有効成分であるケトール脂肪酸の一方のカルボニル基を構成する炭素原子と、他方のヒドロキシル基が結合した炭素原子が α 位又は γ 位の位置にあるケトール脂肪酸を有効成分とする花芽形成誘導剤を提供する。

【0009】請求項4において、その炭素原子同士の結合形式に関し、2重結合が1か所以上、6か所以下存在する、前記請求項1乃至請求項3のいずれかの請求項記載の花芽形成誘導剤の有効成分であるケトール脂肪酸を有効成分とする花芽形成誘導剤を提供する。

【0010】請求項5において、その炭素原子数が18であり、かつその炭素原子同士の結合形式に関し、2重結合が2か所存在する、前記請求項1乃至請求項4のいずれかの請求項記載の花芽形成誘導剤の有効成分であるケトール脂肪酸を有効成分とする花芽形成誘導剤を提供する。

【0011】請求項6において、2位乃至n位のいずれかに位置する炭素原子がヒドロペルオキシ基が結合した炭素原子である、その炭素原子数であるnが4以上24以下であるヒドロペルオキシ脂肪酸を有効成分とする花芽形成誘導剤を提供する。

【0012】請求項7において、前記請求項1乃至請求項6記載のいずれかの花芽形成誘導剤の有効成分であるケトール脂肪酸及び／又はヒドロペルオキシ脂肪酸、並びにノルエビネフリンを有効成分とする花芽形成誘導剤を提供する。

【0013】請求項8において、前記請求項1乃至請求項6記載のいずれかの花芽形成誘導剤の有効成分であるケトール脂肪酸及び／又はヒドロペルオキシ脂肪酸を含有する花芽形成誘導キットを提供する。

【0014】請求項9において、前記請求項1乃至請求項6記載のいずれかの花芽形成誘導剤の有効成分であるケトール脂肪酸及び／又はヒドロペルオキシ脂肪酸、並びにノルエビネフリンを含有する花芽形成誘導キットを提供する。

【0015】請求項10において、その炭素数が4以上24以下の不飽和脂肪酸に、リポキシゲナーゼ (lipoxygenase) を作用させてヒドロペルオキシ不飽和脂肪酸を製造する、前記請求項6記載の花芽形成誘導剤の有効成分であるヒドロペルオキシ脂肪酸の製造方法を提供する。

【0016】請求項11において、リポキシゲナーゼが、選択的にリノール酸の9位の二重結合部分を酸化するリポキシゲナーゼである、前記請求項10記載のヒドロペルオキシ脂肪酸の製造方法を提供する。

【0017】請求項12において、リポキシゲナーゼがコメ胚芽由来のリポキシゲナーゼである、前記請求項11記載のヒドロペルオキシ脂肪酸の製造方法を提供す

る。

【0018】請求項13において、不飽和脂肪酸がリノール酸又は α -リノレン酸である、前記請求項1乃至請求項12のいずれかの請求項記載のヒドロペルオキシ脂肪酸の製造方法を提供する。

【0019】請求項14において、その炭素数が4以上24以下の不飽和脂肪酸に、リポキシゲナーゼを作用させて得られたヒドロペルオキシ不飽和脂肪酸に、さらにアレンオキサイドシンターゼ(allene oxide synthase)を作用させて製造する、前記請求項1乃至請求項5記載のいずれかの花芽形成誘導剤の有効成分であるケトール脂肪酸の製造方法を提供する。

【0020】請求項15において、リポキシゲナーゼが、選択的にリノール酸の9位の二重結合部分を酸化するリポキシゲナーゼである、前記請求項14記載のヒドロペルオキシ脂肪酸の製造方法を提供する。

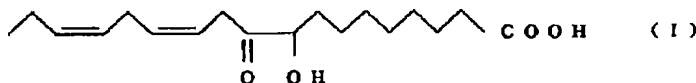
【0021】請求項16において、リポキシゲナーゼがコメ胚芽由来のリポキシゲナーゼである、前記請求項15記載のケトール脂肪酸の製造方法を提供する。

【0022】請求項17において、不飽和脂肪酸が、リノール酸又は α -リノレン酸である、前記請求項14乃至請求項16のいずれかの請求項記載のケトール脂肪酸の製造方法を提供する。

【0023】

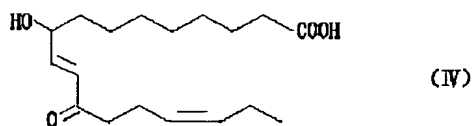
【発明の実施の形態】以下、本発明の実施の形態について説明する。本発明花芽形成誘導剤は、特定のケトール脂肪酸を有効成分とする剤である。このケトール脂肪酸は、上記の通り、2位乃至n位のいずれかに位置する炭素原子から選ばれる異なる2つの炭素原子の一方がカルボニル基を構成する炭素原子であり、他方がヒドロキシル基が結合した炭素原子である、その炭素原子数であるnが4以上24以下のケトール脂肪酸である（以下、このケトール脂肪酸を「本発明関連ケトール脂肪酸」ということもある）。

【0024】すなわち、本発明関連ケトール脂肪酸の一つの特徴は、その炭素骨格にカルボニル基を構成する炭*



【0028】

【化2】



【0029】なお、本発明関連ケトール脂肪酸(II)及び同(III)の化学構造式は、後述するこれらの本発明関連ケトール脂肪酸の化学合成法についての記載の中で開示する。また、そのカルボニル基を構成する炭素原子とヒドロキシル基が結合した炭素原子以外のいずれか1

*炭素原子及びヒドロキシル基が結合した炭素原子が存在するケトール構造をとることである。このケトール構造に関わるカルボニル基を構成する炭素原子及びヒドロキシル基が結合した炭素原子は、上記ケトール脂肪酸の炭素骨格における位置関係は、 α 位又は γ 位であることが、所望する花芽形成誘導活性を発揮するうえで好ましく、特に α 位であることがこの観点から好ましい。

【0025】また本発明関連ケトール脂肪酸は、その炭素原子同士の結合形式に関し、2重結合が1か所以上、6か所以下存在する不飽和ケトール脂肪酸であることが、所望する花芽形成誘導活性を発揮するうえで好ましい。また本発明関連ケトール脂肪酸の炭素数は18であることが好ましい。さらにこの場合には、本発明関連ケトール脂肪酸の炭素原子同士の結合形式に関し、2重結合が2か所存在することが好ましい。なお本発明関連ケトール脂肪酸は、そのカルボニル基を構成する炭素原子とヒドロキシル基が結合した炭素原子以外のいずれか1つの炭素原子にヒドロペルオキシ基が結合した炭素原子を有していてもよい。

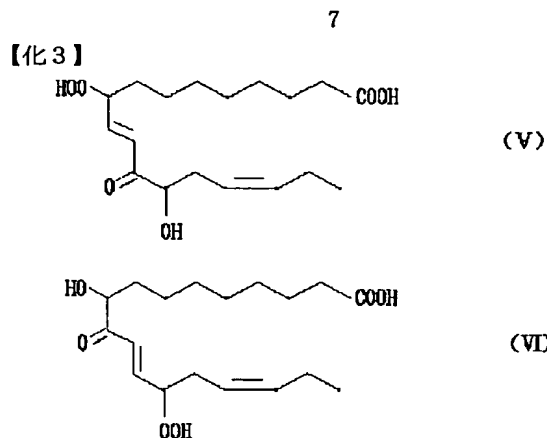
【0026】上述の本発明関連ケトール脂肪酸の具体例としては、例えば9-ヒドロキシ-10-オキソ-12(Z), 15(Z)-オクタデカジエン酸〔以下、本発明関連ケトール脂肪酸(I)ということもある〕、12-オキソ-13-ヒドロキシ-9(Z), 15(Z)-オクタデカジエン酸〔以下、本発明関連ケトール脂肪酸(II)ということもある〕、10-オキソ-13-ヒドロキシ-11(E), 15(Z)-オクタデカジエン酸〔以下、本発明関連ケトール脂肪酸(III)ということもある〕、9-ヒドロキシ-12-オキソ-10(E), 15(Z)-オクタデカジエン酸〔以下、本発明関連ケトール脂肪酸(IV)ということもある〕等を挙げることができる。

【0027】以下に、本発明関連ケトール脂肪酸(I)及び同(IV)の化学構造式を記載する。

【化1】

つの炭素原子にヒドロペルオキシ基が結合した炭素原子を有している本発明関連ケトール脂肪酸としては、例えば9-ヒドロペルオキシ-12-オキソ-13-ヒドロキシ-10(E), 15(Z)-オクタデカジエン酸〔以下、本発明関連ケトール脂肪酸(V)ということもある〕、9-ヒドロキシ-10-オキソ-13-ヒドロペルオキシ-11(E), 15(Z)-オクタデカジエン酸〔以下、本発明関連ケトール脂肪酸(VI)ということもある〕等を挙げることができる。

【0030】以下に、本発明関連ケトール脂肪酸(V)及び同(VI)の化学構造式を記載する。



【0031】上述の本発明関連ケトール脂肪酸のうち、少なくとも一部は動植物における脂肪酸代謝物質の中間体として知られているが、これらが直接植物において果たす役割については知られていない。例えば、本発明関連ケトール脂肪酸（I）は、生体内に豊富に存在する α -リノレン酸を出発物質とする脂肪酸代謝経路の中間体として知られている。しかしながら、この本発明関連ケトール脂肪酸（I）が直接植物において果たす役割については知られていない。本発明者はこれらの本発明関連ケトール不飽和脂肪酸が、広く植物における花芽誘導作用を有することを見出した。

【0032】A. まず、本発明関連ケトール脂肪酸の製造方法について説明する。本発明関連ケトール脂肪酸は、所望するケトール脂肪酸の具体的構造に応じた方法で製造することができる。すなわち、①天然物に含まれていることが明らかな態様の本発明関連ケトール脂肪酸は、この天然物から抽出精製することで製造することができる（以下、抽出法という）。また、②不飽和脂肪酸にリボキシゲナーゼ等の酵素を、植物体内における脂肪酸代謝経路に準じて作用させることにより本発明関連ケトール脂肪酸を得ることができる（以下、酵素法という）。さらに、③所望する本発明関連ケトール脂肪酸の具体的構造に応じて、通常公知の化学合成法を駆使して本発明関連ケトール脂肪酸を得ることができる（以下、化学合成法という）。

【0033】①抽出法について：上記本発明関連ケトール脂肪酸（I）は、ウキクサ科植物の一種であるアオウキクサ（*Lemna paucicostata*）から抽出・精製して得ることができる。この抽出法における原材料となるアオウキクサ（*Lemna paucicostata*）は、池や水田の水面に浮遊する、水面に浮かぶ葉状体が各々1本の根を水中に下ろす小型の水草である。花は、葉状体の体側に形成され、1本の雄しべだけからなる雄花2個と1個の雌しべからなる雌花が、共通した小さな苞に包まれている。

【0034】このアオウキクサは、比較的増殖速度が速く（すなわち、花成形成が速い。例えば、後述するアッセイ系において花芽誘導のチェック用に用いられたアオウキクサ151系はわずか7日間以下で花成を行

う。）、また日長を変えることによって容易に花芽形成誘導を制御できる等の花芽形成に関連するアッセイ系として優れた性質を有している。

【0035】このアオウキクサの破砕物をインキュベートしたものには、少なくともアオウキクサに対する花芽誘導活性が認められている。そして、さらにこの破砕物に遠心分離（8000×g・10分間程度）を施し、得られた上清と沈澱物のうち、上清を除いたものを本発明ケトール脂肪酸（I）を含む画分として用いることができる。このように、本発明ケトール脂肪酸（I）は、上記破砕物を出発物として単離・精製することが可能である。

【0036】そして、さらに調製効率の上で好ましい出発物として、アオウキクサを浮かばせた又は浸漬した後の水溶液を挙げることができる。この水溶液は、アオウキクサが生育可能なものである限りにおいて特に限定されない。この水溶液の調整の具体例は、後述する実施例において記載する。

【0037】浸漬時間は、室温で2～3時間程度でも可能であるが、特に限定されるべきものではない。また、上記した方法で本発明ケトール脂肪酸（I）の出発物を調製する場合に、あらかじめアオウキクサに本発明ケトール脂肪酸（I）を誘導することができる特定のストレスを与えることが、本発明ケトール脂肪酸（I）の製造効率上好ましい。

【0038】具体的には、乾燥ストレス、熱ストレス、浸透圧ストレス等を前記特定のストレスとして挙げることができる。乾燥ストレスは、例えば低湿度（好ましくは相対湿度で50%以下）で室温下、好ましくは24～25℃程度で、アオウキクサを乾燥したフィルター紙上に広げた状態で放置することによって与えることができる。この場合の乾燥時間は、概ね20秒以上、好ましくは5分以上、より好ましくは15分以上である。

【0039】熱ストレスは、例えば温水中にアオウキクサを浸漬することによって与えることができる。この場合の温水の温度は、40℃～65℃で可能であり、好ましくは45℃～60℃、より好ましくは50℃～55℃である。また、温水に処理する時間は、概ね5分程度で足るが、比較的低温の場合、例えば40℃程度の温水中でアオウキクサを処理する場合は、2時間以上処理することが好ましい。また、上記熱ストレス処理後は、速やかにアオウキクサを冷水中に戻すことが好ましい。

【0040】浸透圧ストレスは、例えば高濃度の糖溶液等の高浸透圧溶液にアオウキクサを接触させることにより与えることができる。この場合の糖濃度は、例えばマンニトール溶液であれば0.3M以上、好ましくは0.5M以上であることが好ましい。処理時間は、例えば0.5Mマンニトール溶液を用いる場合は1分以上、好ましくは3分以上である。このようにして、所望する本発明ケトール脂肪酸（I）を含む出発物を調製すること

ができる。

【0041】なお、上記した種々の出発物の基となるアオウキクサの株は特に限定されないが、特に効率良く花芽誘導物質を生産する株（例えば、アオウキクサ441系）を用いることが好ましい。このようなアオウキクサの株は、通常の選抜方法を用いて確保することも可能であり、遺伝子工学的な手法を用いて確保することも可能である。

【0042】次に、上記のように調製した出発物に以下のような分離・精製手段を施して、所望する本発明ケトール脂肪酸（I）を製造することができる。なお、ここに示す分離手段は例示であり、これらの分離手段に上記出発物から本発明ケトール脂肪酸（I）を製造するための分離手段が限定されるものではない。

【0043】まず、上記出発物に対して溶媒抽出を行い、本発明関連ケトール脂肪酸（I）を含有する成分を抽出することが好ましい。かかる溶媒抽出に用いる溶媒は特に限定されるものではなく、例えばクロロホルム、酢酸エチル、エーテル、ブタノール等を用いることができる。これらの溶媒の中でもクロロホルムは、比較的容易に不純物を除去することが可能であるという点において好ましい。

【0044】この溶媒抽出で得られた油層画分を、通常公知の方法を用いて洗浄・濃縮し、ODS（オクタデシルシレン）カラム等の逆相分配カラムクロマトグラフィー用カラムを用いた高速液体クロマトグラフィー（HPLC）にかけて、花芽誘導活性画分を同定・単離することにより本発明関連ケトール脂肪酸（I）を単離することができる。なお、出発物の性質等に応じて通常公知の他の分離手段、例えば限外濾過、ゲル濾過クロマトグラフィー等を組み合わせて用いることも勿論可能である。

【0045】以上、本発明関連ケトール脂肪酸（I）を抽出法で製造する工程について説明したが、所望する態様の本発明関連ケトール脂肪酸が生体中に存在する場合には、上記に準じた方法や、上記の方法の変法を駆使することにより、その本発明関連ケトール脂肪酸を製造することが可能である。

【0046】②酵素法について：酵素法の出発物質として典型的なものとしては、所望する本発明関連ケトール脂肪酸の構造に応じた位置に二重結合が存在する、その炭素数が4以上24以下の不飽和脂肪酸を挙げることができる。

【0047】この不飽和脂肪酸としては、例えばオレイン酸、バクセン酸、リノール酸、 α -リノレン酸、 γ -リノレン酸、アラキドン酸、9,12-octadecadienoic acid、9,11 (10,12)-octadecadienoic acid、9,12,15-octadecatrienoic acid、6,9,12,15-octadecatetraenoic acid、11,14-eicosadienoic acid、5,8,11-eicosatrienoic acid、5,8,11-eicosatriynoic acid、11,14,17-eicosatrienoic acid、5,8,11,14,17-eicosapentaenoic

acid、13,16-docosadienoic acid、13,16,19-docosatrienoic acid、7,10,13,16-docosatetraenoic acid、7,10,13,16,19-docosapentaenoic acid、4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid等を挙げることができるが、これらの不飽和脂肪酸に限定されるものではない〔なお、これらの不飽和脂肪酸において、立体異性体はトランス体(trans-)であってもシス体(cis-)であってもよい〕。

【0048】これらの不飽和脂肪酸は、概ね動物・植物等に含まれている不飽和脂肪酸であり、これらの動物・植物等から通常公知の方法を通じて抽出・精製したものや、通常公知の方法により化学合成したものをを用いることも可能であり、市販品を用いることも勿論可能である。

【0049】この酵素法においては、上記の不飽和脂肪酸を基質として、リボキシゲナーゼ（LOX）を作用させて、これらの不飽和脂肪酸の炭素鎖にヒドロペルオキシ基（-OOH）を導入する。リボキシゲナーゼは、不飽和脂肪酸の炭素鎖に分子状酸素をヒドロペルオキシ基として導入する酸化還元酵素であり、動物・植物を問わず、またサッカロミセス属に属する酵母に代表される酵母においてもその存在が確認されている酵素である。

【0050】例えば、植物であれば被子植物全般〔具体的には、後述する本発明花芽形成誘導剤を適用可能な双子葉植物及び単子葉植物全般〕において、その存在が確認されている酵素である。これらの植物の中でも特にダイズ、アマ、アルファルファ、大麦、ソラマメ、ハウチワマメ、ヒラマメ、エンドウマメ、ジャガイモ、小麦、リンゴ、パンイースト、綿、キュウリ、スグリ、ブドウ、西洋ナシ、インゲンマメ、コメ、イチゴ、ヒマワリ、茶等がリボキシゲナーゼの出所としては好ましい。また、クロロフィルがリボキシゲナーゼの上記活性を阻害する傾向が強いために、可能な限り植物におけるクロロフィルが存在しない種子、根、果実等をリボキシゲナーゼの原料として選択することが好ましい。

【0051】本発明においてリボキシゲナーゼは、不飽和脂肪酸の炭素鎖の所望する位置にヒドロペルオキシ基を導入することができるものであれば、その由来は特に限定されないが、可能な限り選択的にリノール酸の9位の二重結合部分を酸化するリボキシゲナーゼを用いることが、所望する本発明関連ケトール脂肪酸の収率を向上させ得るという点において非常に好ましい。

【0052】かかる選択的リボキシゲナーゼの代表的なリボキシゲナーゼとして、例えばコメ胚芽（rice germ）に由来するリボキシゲナーゼを挙げることができる〔Yamamoto, A., Fuji, Y., Yasumoto, K., Mitsuda, H., Agric. Bio. Chem., 44, 443(1980)等〕。そして、この選択的リボキシゲナーゼに対する基質として選択する不飽和脂肪酸としては、リノール酸又は α -リノレン酸を用いることが好ましい。

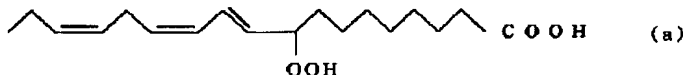
【0053】なお、不飽和脂肪酸を基質としてリボキシ

グナーゼ処理を行うに際しては、用いるリポキシゲナーゼの至適温度及び至適pHで酵素反応を進行させることが好ましいのは当然である。また、上記のリポキシゲナーゼ反応工程により生じた、製造を企図しない夾雑物は、通常公知の方法、例えば上記①の欄で述べたHPLC等を用いることにより、容易に分離することが可能である。

【0054】ここで用いられるリポキシゲナーゼは、通常公知の方法により、上記植物等から抽出・精製したものをを用いることも、市販品を用いることも可能である。このようにして、上記不飽和脂肪酸からヒドロペルオキシ不飽和脂肪酸を製造することができる。

【0055】このヒドロペルオキシ不飽和脂肪酸は、本発明関連ケトール脂肪酸の酵素法による製造工程の中間体として位置づけることが可能であり、しかもこのヒドロペルオキシ不飽和脂肪酸自体にも花芽形成誘導促進作用が認められる（後述の試験例参照のこと）。この意味で本発明は前記の通り、2位乃至n位のいずれかに位置する炭素原子がヒドロペルオキシ基が結合した炭素原子である、その炭素原子数であるnが4以上24以下であ

10



【0059】

【0060】次いで、このヒドロペルオキシ不飽和脂肪酸を基質として、アレノオキサイドシンターゼを作用させることによって、所望する本発明関連ケトール脂肪酸を製造することができる。

【0061】アレノオキサイドシンターゼは、ヒドロペルオキシ基をエポキシ化を経てケトール体に変換する活性を有する酵素であり、前記リポキシゲナーゼと同様に植物、動物及び酵母においてその存在が考えられる酵素であり、植物であれば被子植物全般〔具体的には、後述する本発明花芽形成誘導剤を適用可能な双子葉植物及び単子葉植物全般〕において、存在していると考えられる酵素である。なお、このアレノオキサイドシンターゼは植物であれば、大麦、小麦、トウモロコシ、綿、ナス、アマ（種等）、チシャ、エンバク、ハウレンソウ、ヒマワリ等においてその存在が認められている。

【0062】本発明においてアレノオキサイドシンターゼは、例えば上記の9-ヒドロペルオキシ-10

(E), 12 (Z), 15 (Z)-オクタデカトリエン酸の9位のヒドロペルオキシ基を脱水することによりエポキシ基を形成させ、さらにOH⁻の求核反応により、所望する本発明関連ケトール脂肪酸を結果として得ることができる限りにおいて特に限定されるものではない。

【0063】ところで、上記のアレノオキサイドシンターゼ処理を行うに際しては、用いるアレノオキサイドシ

30

40

50

* るいヒドロペルオキシ脂肪酸を有効成分とする花芽形成誘導剤をも提供する発明である。

【0056】このヒドロペルオキシ不飽和脂肪酸としては、例えば上記本発明関連ケトール脂肪酸 (I) の中間体として、 α -リノレン酸にリポキシゲナーゼを作用させて得ることができる9-ヒドロペルオキシ-10

(E), 12 (Z), 15 (Z)-オクタデカトリエン酸又は13-ヒドロペルオキシ-9 (Z), 11 (E), 15 (Z)-オクタデカトリエン酸を挙げることができる。

【0057】これらのヒドロペルオキシ脂肪酸のうち、前者の9-ヒドロペルオキシ-10 (E), 12

(Z), 15 (Z)-オクタデカトリエン酸を本発明関連ヒドロペルオキシ脂肪酸 (a) として、また後者の13-ヒドロペルオキシ-9 (Z), 11 (E), 15 (Z)-オクタデカトリエン酸を本発明関連ヒドロペルオキシ脂肪酸 (b) として、これらの化学構造式を以下に記載する。

【0058】

【化4】

【化5】



ンターゼの至適温度及び至適pHで酵素反応を進行させることが好ましいのは当然である。また、ここで用いられるアレノオキサイドシンターゼは、通常公知の方法により、上記植物等から抽出・精製したものをを用いることも、市販品を用いることも可能である。

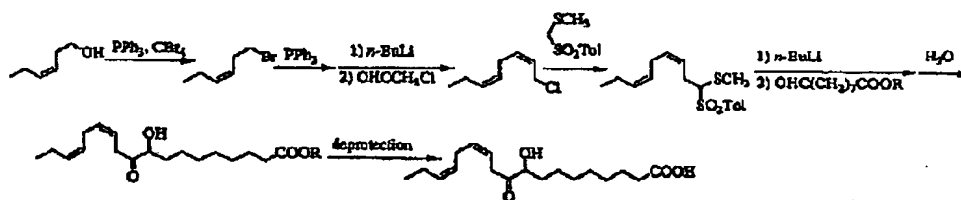
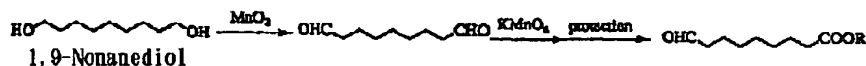
【0064】上記の2工程の酵素反応は、別々に行うことも、連続して行うことも可能である。さらに、上記酵素の粗精製品又は精製品を上記酵素反応を進行させるために用いて、所望する本発明関連ケトール不飽和脂肪酸を得ることが可能である。また、上記酵素を担体に固定して、これらの固定化酵素を調製してカラム処理又はバッチ処理等を基質に施すことにより所望する本発明関連ケトール脂肪酸を得ることができる。

【0065】なお、エポキシ基を形成させた後のOH⁻の求核反応（上記）により本発明関連ケトール脂肪酸を得ようとする場合に、その求核物の上記エポキシ基付近における作用形式によっては、 α -ケトール不飽和脂肪酸の他に、 γ -ケトール化合物が生成する。この γ -ケトール化合物は、上記①の欄で述べたHPLC等の通常公知の分離手段を用いることにより、容易に α -ケトール化合物と分離することができる。

【0066】③化学合成法について：また、本発明関連ケトール脂肪酸は、通常公知の化学合成法を駆使することにより製造することもできる。例えば、その一端にア

ルデヒド基等の反応性基を有し、他端に保護基を結合させたカルボキシル末端を付加させた飽和炭素鎖を通常公知の方法により合成し、これとは別にcis2-ヘキセン-1-オール等の不飽和アルコール等を出発物質として、所望の位置に不飽和基を有する反応性末端を有する不飽和炭素鎖とを合成する。次いで、上記飽和炭化水素鎖とこの不飽和炭素鎖とを反応させて、本発明関連ケトール化合物を製造することができる。なお、この一連の反応において、反応を企図しない末端に付加する保護基や反応を促進するための触媒は、具体的な反応様式に応じて適宜選択して用いることができる。さらに具体的には、例えば以下のような手順で本発明関連ケトール脂肪酸を合成することができる。

【0067】i)本発明関連ケトール脂肪酸(I)の合成
Nonanedioic acid mono ethylesterを出発原料として、
N,N'-carbonyldiimidazoleと反応させ、酸イミダゾリド
とした後に、低温でLiAlH₄還元して、対応するアルデヒド*



【0070】ii) 本発明関連ケトール化合物(II)の合成
Nonanedioic acid mono ethylester を出発原料として、塩化チオニルと反応させることにより、これを酸クロリドとした後で、NaBH₄還元を行い、酸アルコールを生成させる。次いで、この酸アルコールの遊離カルボンを保護した後に、triphenyl phosphine 及びcarbon tetrabromide と反応させ、得られた臭化化合物にtriphenyl phosphine を反応させ、さらにn-BuLiの存在下でch※

*ドを合成する。なお、上記出発物質を例えば1,9-Nonanediol等のジオールとして、同様のアルデヒドを合成することも可能である。

【0068】これとは別に、cis2-ヘキセン-1-オール(cis2-hexen-1-ol)をtriphenyl phosphine 及びcarbon tetrabromide と反応させ、得られた臭化化合物にtriphenyl phosphine を反応させ、さらにn-BuLiの存在下でchloroacetaldehydeと反応させることによりcis オレフィンを構築し、さらにこれにmethylthio methyl p-tosyl sulfone と反応後、NaH の存在下、上記のアルデヒドと反応させて誘導した2級アルコールをtert-butyl diphenylsilylchlorideで保護して、酸加水分解、次いで脱保護することにより、所望する本発明関連ケトール脂肪酸(I)を合成することができる。

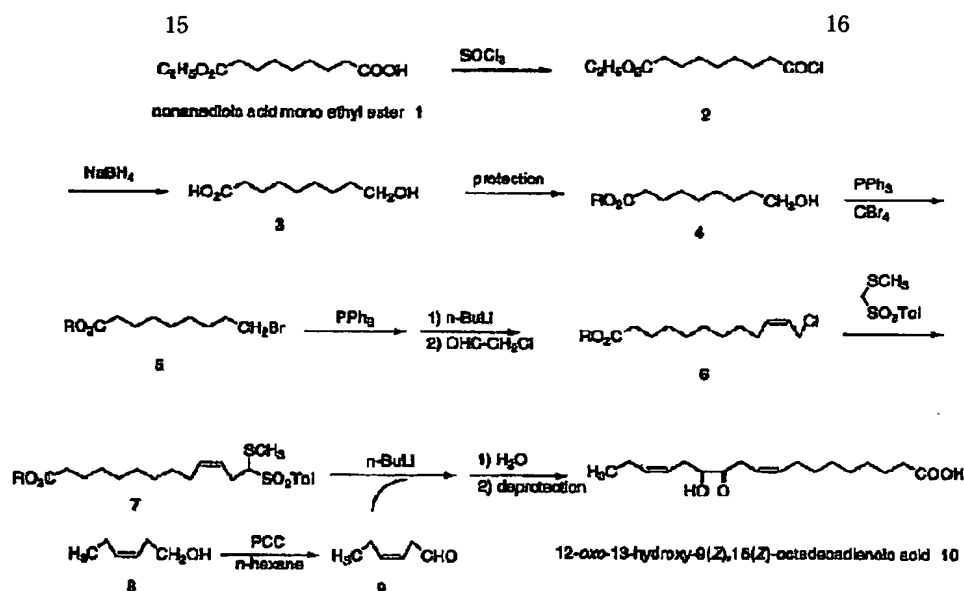
【0069】以下に、この本発明関連ケトール脂肪酸(I)の合成工程の一例の簡単な工程図を示す。

【化6】

※loroacetaldehydeと反応させることによりcis オレフィンを構築し、さらにこれにmethylthiomethyl p-tosyl sulfone と反応後、n-BuLiの存在下で、これを別にcis2-hexen-1-ol のPCC 酸化により誘導したアルデヒドと反応させ、最後に脱保護することにより、所望する本発明関連ケトール脂肪酸(II)を合成することができる。

【0071】以下に、この本発明関連ケトール脂肪酸(II)の合成工程の一例の簡単な工程図を示す。

【化7】

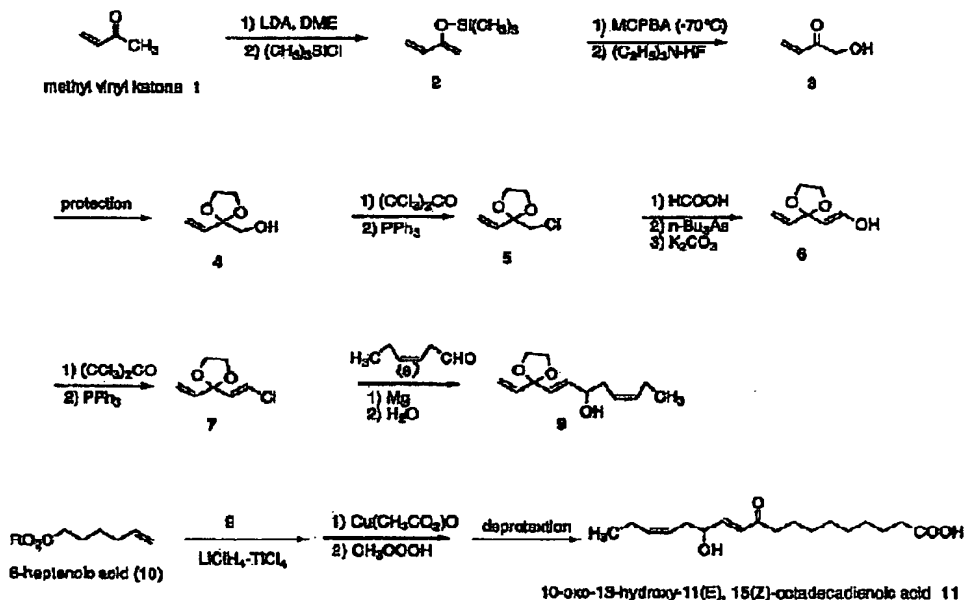


【0072】iii)本発明ケトール化合物(III)の合成
 Methyl vinyl ketoneを出発原料とし、LDA及びDMEの
 存在下でtrimethylsilylchlorideを反応させ、得られた
 シルエーテルを、低温(-70℃)でMCPBA及びtrimethy
 laminehydrofluoric acidを添加してケトアルコールを
 調製する。次いでこのケトアルコールのカルボニル基を
 保護した後に、triphenyl phosphine及びtrichloroace
 toneを反応試薬に用いて、オレフィンに塩化物を付加さ
 せることなく反応させ、この反応物をtributylarsine及
 び K_2CO_3 の存在下で、formic acidを反応させ、trans *

*オレフィンを構築して塩化物とする。次いで、この塩化
 物とcis2-hexen-1-olのPCC酸化により誘導したアルデ
 ヒドと反応させて、この反応物と6-heptenonic acidと
 の結合反応を行い、最後に脱保護することにより、所望
 する本発明関連ケトール脂肪酸(III)を合成すること
 ができる。

【0073】以下に、この本発明関連ケトール脂肪酸
 (III)の合成工程の一例の簡単な工程図を示す。

【化8】



【0074】なお、花芽形成の促進を図る植物の種類に
 よっては、上記の本発明関連ケトール脂肪酸と、神経伝
 達物質としてよく知られているノルエピネフリンを補助
 成分として組み合わせて用いることにより、所望する花
 芽形成誘導作用を十分に発揮させ得るものもあるが、こ
 の際に用いられるノルエピネフリンは、通常公知の方法

により合成したものを用いることもできるが、市販品を
 用いることも勿論可能である。本発明では、天然型であ
 る(-)形ノルエピネフリンだけではなく、(+)形の
 ノルエピネフリン、さらにはこれらの混合物をも用いる
 ことができる。

【0075】B. このようにして製造される、本発明関

連ケトール脂肪酸並びに本発明関連ケトール脂肪酸及びノルエピネフリン等の補助成分を有効成分とする花芽形成誘導剤（以下、本発明花芽形成誘導剤という。）が提供される。本発明花芽形成誘導剤のうち、本発明関連ケトール脂肪酸のみを有効成分とするものは、これ単独で植物の花芽形成の誘導促進を図ったり、潜在的に植物において存在するノルエピネフリン等の補助成分との組合せにおいて所望の花芽形成誘導作用を発揮させたり、植物の種類や状態に応じてこの形態の本発明花芽形成誘導剤とノルエピネフリン製剤等の補助成分製剤とを組み合わせ用いて所望の花芽形成誘導作用を発揮させることを図るものである。

【0076】また、本発明花芽形成誘導剤のうち、本発明関連ケトール脂肪酸及びノルエピネフリン等の補助成分を有効成分とする形態では、例えば植物において、最も本発明花芽形成誘導剤の花芽形成誘導作用が強い割合で、上記両者の有効成分を配合して使用の便宜を図り得る。

【0077】本発明花芽形成誘導剤における、本発明関連ケトール脂肪酸とノルエピネフリン等の補助成分との配合割合は、上記の目的に応じ、さらに用いる植物の性質及び本発明ケトール脂肪酸の具体的態様等に応じて適宜調整され得るもので、特に限定されるものではない。例えば、アオウキクサ等のうきくさ科植物において、植物中のノルエピネフリンの存在等を考慮しない場合に、主要成分として本発明関連ケトール脂肪酸（I）を用いる場合には、両者〔本発明関連ケトール脂肪酸（I）とノルエピネフリン〕を等モル濃度で配合することが、より効果的に本発明の所期の効果が発揮され得るという点において好ましい。うきくさ科植物において、この両者を等モル濃度で配合しない場合には、配合量の少ない方の配合成分の濃度で両者を配合した場合と同程度の効果しか発揮されない傾向にある。

【0078】また、本発明花芽形成誘導剤は、これを用いる対象の植物の性質に応じた処理を行いつつ投与することが効果的である場合が多い。例えば、後述する実施例のアサガオ等の短日植物の場合には、一定の暗処理を行いながら本発明花芽形成誘導剤を用いることが効果的である。

【0079】上記の有効成分はそのまま本発明花芽形成誘導剤として用いることも可能であるが、植物に適用可能な所望の剤形、例えば液剤、固形剤、粉剤、乳剤、底床添加剤等の剤形に応じて製剤学上適用することが可能な公知の担体成分、製剤用補助剤等を本発明の所期の効果である花芽形成誘導が損なわれない限度において、適宜配合することができる。例えば、担体成分としては、本発明花芽形成誘導剤が底床添加剤又は固形剤である場合には、概ねタルク、クレー、バーミキュライト、珪藻土、カオリン、炭酸カルシウム、水酸化カルシウム、白土、シリカゲル等の無機質や小麦粉、澱粉等の固体担体

が；また液剤である場合には、概ね水、キシレン等の芳香族炭化水素類、エタノール、エチレングリコール等のアルコール類、アセトン等のケトン類、ジオキサン、テトラヒドロフラン等のエーテル類、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、アセトニトリル等の液体担体が上記の担体成分として用いられる。また製剤用補助剤としては、例えばアルキル硫酸エステル類、アルキルスルホン酸塩、アルキルアリールスルホン酸塩、ジアルキルスルホコハク酸塩等の陰イオン界面活性剤、高級脂肪族アミンの塩類等の陽イオン界面活性剤、ポリオキシエチレングリコールアルキルエーテル、ポリオキシエチレングリコールアシルエステル、ポリオキシエチレングリコール多価アルコールアシルエステル、セルロース誘導体等の非イオン界面活性剤、ゼラチン、カゼイン、アラビアゴム等の増粘剤、増量剤、結合剤等を適宜配合することができる。

【0080】さらに必要に応じて、植物生長調節剤や、安息香酸、ニコチン酸、ニコチン酸アミド、ピペコリン酸等を、上記の本発明の所期の効果を損なわない限度において、本発明花芽形成誘導剤中に配合することもできる。上記本発明花芽形成誘導剤は、その剤形に応じた方法で種々の植物に用いられる。例えば、本発明においては、開花を図る植物の生長点のみならず、茎や葉をはじめとする植物体の一部又は全体に液剤や乳剤として散布、滴下、塗布等することや、固形剤や粉剤として地中から根に吸収させること等が可能である。また、開花を図る植物がウキクサ等の水草の場合には、底床添加剤として根から吸収させたり、固形剤を水中で徐々に溶解させること等も可能である。

【0081】なお、本発明においては、上記の有効成分である本発明関連ケトール脂肪酸、並びに本発明関連ケトール脂肪酸及びノルエピネフリンを含有するキットの形態をとる花芽形成誘導用キットをも提供するものであるが、この本発明花芽形成誘導用キットの目的及び効果は上記の本発明花芽形成誘導剤と同様である。また、本発明花芽形成誘導剤及び本発明花芽形成誘導用キットを適用可能な植物の種類は特に限定されず、双子葉植物、単子葉植物の両者に対して本発明花芽形成誘導剤は有効である。

【0082】双子葉植物としては、例えばアサガオ属植物（アサガオ）、ヒルガオ属植物（ヒルガオ、コヒルガオ、ハマヒルガオ）、サツマイモ属植物（グンバイヒルガオ、サツマイモ）、ネナシカズラ属植物（ネナシカズラ、マメダオシ）が含まれるひるがお科植物、ナデシコ属植物、ハコベ属植物、タカネツメクサ属植物、ミミナグサ属植物、ツメクサ属植物、ノミノツツリ属植物、オオヤマフスマ属植物、ワチガイソウ属植物、ハマハコベ属植物、オオツメクサ属植物、シオツメクサ属植物、マンテマ属植物、センノウ属植物、フシグロ属植物、ナンバンハコベ属植物等のなでしこ科植物をはじめ、もくま

もう科植物、どくだみ科植物、こしょう科植物、せんりょう科植物、やなぎ科植物、やまもも科植物、くるみ科植物、かぼのき科植物、ぶな科植物、にれ科植物、くわ科植物、いらくさ科植物、かわごけそう科植物、やまもがし科植物、ぼろぼろのき科植物、びやくだん科植物、やどりぎ科植物、うまのすずくさ科植物、やっこそう科植物、つちとりもち科植物、たで科植物、あかざ科植物、ひゆ科植物、おしろいばな科植物、やまとぐさ科植物、やまごぼう科植物、つるな科植物、すべりひゆ科植物、もくれん科植物、やまぐるま科植物、かつら科植物、すいれん科植物、まつも科植物、きんぼうげ科植物、あけび科植物、めぎ科植物、つづらふじ科植物、ろうばい科植物、くすのき科植物、けし科植物、ふうちょうそう科植物、あぶらな科植物、もうせんごけ科植物、うつばかずら科植物、べんけいそう科植物、ゆきのした科植物、とべら科植物、まんさく科植物、すずかけのき科植物、ばら科植物、まめ科植物、かたばみ科植物、ふうろそう科植物、あま科植物、はまびし科植物、みかん科植物、にがき科植物、せんだん科植物、ひめはぎ科植物、とうだいぐさ科植物、あわごけ科植物、つげ科植物、がんこうらん科植物、どくうつぎ科植物、うるし科植物、もちのき科植物、にしきぎ科植物、みつばうつぎ科植物、くろたきかずら科植物、かえで科植物、とちのき科植物、むくろじ科植物、あわぶき科植物、つりふねそう科植物、くろうめもどき科植物、ぶどう科植物、ほととのき科植物、しなのき科植物、あおい科植物、あおぎり科植物、さるなし科植物、つばき科植物、おとぎりそう科植物、みぞはこべ科植物、ぎよりゅう科植物、すみれ科植物、いざり科植物、きぶし科植物、とけいそう科植物、しゅうかいどう科植物、さぼてん科植物、じんちょうげ科植物、ぐみ科植物、みそはぎ科植物、ざくろ科植物、ひるぎ科植物、うりのき科植物、のぼたん科植物、ひし科植物、あかばな科植物、ありのとうぐさ科植物、すぎなも科植物、うごぎ科植物、せり科植物、みずき科植物、いわうめ科植物、りょうぶ科植物、いちやくそう科植物、つつじ科植物、やぶこうじ科植物、さくらそう科植物、いそまつ科植物、かきのき科植物、はいのき科植物、えごのき科植物、もくせい科植物、ふじうつぎ科植物、りんどう科植物、きょうちくとう科植物、ががいも科植物、はなしのぶ科植物、むらさき科植物、くまつづら科植物、しそ科植物、なす科植物、ごまのはぐさ科植物、のうぜんかずら科植物、ごま科植物、はまうつば科植物、いわたばこ科植物、たぬきも科植物、きつねのまご科植物、はまじんちょう科植物、はえどくそう科植物、おおばこ科植物、あかね科植物、すいかずら科植物、れんぶくそう科植物、おみなえし科植物、まつむしそう科植物、うり科植物、ききょう科植物、きく科植物等を例示することができる。

【0083】単子葉植物としては、例えばウキクサ属植物（ウキクサ）及びアオウキクサ属植物（アオウキク

サ、ヒンジモ）が含まれる、うきくさ科植物、カトレア属植物、シンビジウム属植物、デンドロビウム属植物、ファレノプシス属植物、バンダ属植物、パフィオペディラム属植物、オンシジウム属植物等が含まれる、らん科植物、がま科植物、みくり科植物、ひるむしろ科植物、いばらも科植物、ほろむいそう科植物、おもだか科植物、とちかがみ科植物、ほんごうそう科植物、いね科植物、かやつりぐさ科植物、やし科植物、さといも科植物、ほしぐさ科植物、つゆくさ科植物、みずあおい科植物、いぐさ科植物、びやくぶ科植物、ゆり科植物（アスパラガス等）、ひがんばん科植物、やまのいも科植物、あやめ科植物、ばしょう科植物、しょうが科植物、かなな科植物、ひなのしゃくじょう科植物等を例示することができる。

【0084】

【実施例】以下、実施例等により、本発明をより具体的に説明する。ただし、これらの実施例等により、本発明の技術的範囲が限定されるべきものではない。

A. 抽出法で得た本発明関連ケトール脂肪酸（I）における検討：

【製造例A】短日処理を行って花芽形成を1回のみ行ったアオウキクサ（*Lemna paucicostata*）の441系統（以下、「P441」という。京都大学農学部 瀧本敦名誉教授より入手、以後、必要に応じて分譲する用意あり）を、24～25℃で昼光色蛍光灯で継続的に照射を行ないながら（Hitachi FL20 SSDで植物に対して約5 W/m²の割合で照射）1%のショ糖を含む1/2希釈のハトナー培地〔Hutner's medium: Hutner 1953；なお、ハトナー培地（希釈なし）の組成は、KH₂PO₄ (400mg), NH₄N O₃ (200mg), EDTA・2K (690mg), Ca(NO₃)₂・4H₂O (354mg), Mg SO₄・7H₂O (500mg), FeSO₄・7H₂O (24.9mg), MnCl₂・4H₂O (17.9mg), ZnSO₄・7H₂O (65.9mg), CaSO₄・5H₂O (3.95mg), Na₂ MoO₄・2H₂O (14.2mg), H₃BO₃ (14.2mg), Co(MoO₃)₂・6H₂O (0.2mg) / 1000ml 蒸留水 (pH 6.2～6.4) である。〕中で、無菌的に培養して継代保存した。

【0085】次に、このP441の培養物を、蒸留水で洗浄してから、2μMのFe-EDTAを含む1/10希釈のE培地〔Cleland and Briggs 1967；なお、1/10 E培地の組成は、Ca(NO₃)₂・4H₂O (118mg), MgSO₄・7H₂O (49.2mg), KH₂PO₄ (68.0mg), KNO₃ (115mg), FeCl₃・6H₂O (0.54mg), tartarate (0.30mg), H₃BO₃ (0.29mg), ZnSO₄・7H₂O (0.022mg), Na₂MoO₄・2H₂O (0.013mg), CuSO₄・5H₂O (0.008mg), MnCl₂・4H₂O (0.36mg), EDTA・2K (1.21mg), EDTA・NaFe (III) salt (0.77mg) / 1000ml 蒸留水である。〕中に移植して、これを非無菌的に6～12日間24～25℃で継続的に光照射（約5 W/m²）を行 いながら培養した。

【0086】このようにして調製したP441の培養物を、乾燥したフィルター紙上に広げた状態で、低湿度（相対湿度で50%以下）で24～25℃程度で15時間放置して、乾燥ストレスをかけた。この乾燥ストレス

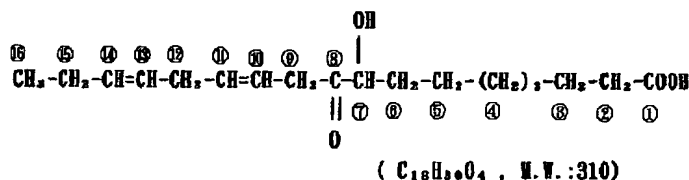
* 得た。

【0089】この乾固物の構造を決定するために、 ^{13}C -NMRで化学シフト値を求めた（重メタノールと重酢酸を各1滴ずつ混合したものに、上記乾固物を溶解させて測定サンプルとした）。

【0090】その結果、この化学シフト値及びこの化学シフト値から決定付けられる化学構造式は以下のように決定付けられた。1:178.47 (s), 2:35.71 (t), 3:26.82* (t), 4:31.11 (t), 5:26.92* (t), 6:35.36 (t), 7:78.61 (d), 8:213.78 (s), 9:38.38 (t), 10:122.95 (d), 11:133.45 (d), 12:27.46 (t), 13:128.38 (d), 14:134.55 (d), 15:22.28 (t), 16:15.39 (q) (チャートは第1図参照。なお、これらの化学シフト値の頭付きの数字は、下記化学構造式の炭素原子を示す丸付き数字の番号にそれぞれ対応する。)。*は帰属不明であることを示している。

【0091】

【化9】



※【0093】すなわち、まず上記の本発明関連ケトール脂肪酸（I）0.155mgを0.15mlの水に溶解し、そこに10mMのノルエピネフリン50 μ lと0.5Mのトリスバッファー（pH8.0）25 μ lを加えた。その溶液を25℃で6時間インキュベートした。次に、本発明関連ケトール脂肪酸（I）とノルエピネフリンの濃度を第1表に示した濃度となるように、上の条件でインキュベートした溶液を、30mlフラスコ中のアッセイ培地（1/10E培地+1 μ mベンジルアデニン、シュークロースは添加せず）10ml中に添加した。

【0094】

※ 【表1】

第 1 表

	NE eq	FC eq		NE eq	FC eq
A	0.3μM	7.8nM	D	0.3μM	2.9nM
A	3μM	78nM	D	3μM	29nM
A	10μM	260nM	D	10μM	98nM
B	0.3μM	78nM	E	0.3μM	29nM
B	3μM	780nM	E	3μM	290nM
B	10μM	2.6mM	E	10μM	980nM
C	30nM	78nM	F	30nM	29nM
C	100nM	260nM	F	100nM	98nM
C	0.3μM	780nM	F	0.3μM	290nM
C	3μM	7.8μM	F	3μM	2.9μM
C	10μM	26μM	F	10μM	9.8μM

〔表中、NEはノルエピネフリンを、FCは本発明関連ケトール脂肪酸を表す（以下同様）。〕

【0095】これらの本発明関連ケトール脂肪酸（I）を、各濃度添加したアッセイ培地上に、P151のコロニーを1つ植えて、24～25℃で昼光色蛍光灯で継続的に照射を行ないながら（Hitachi FL20 SSDで植物に対して約5W/m²の割合で照射）7日間培養して、上記＊

第2表

	30nM NE	100nM NE	0.8μM NE	3.0μM NE	10μM NE
A	—	—	1.6±1.6	29.6±3.5	51.6±2.4
B	—	—	29.0±10.3	34.7±4.4	44.8±0.7
C	3.0±3.0	40.8±2.1	46.3±3.6	56.2±1.2	58.2±1.1
D	—	—	—	16.3±6.4	60.6±7.0
E	—	—	1.9±1.1	61.6±1.2	65.0±0.4
F	11.7±2.7	39.2±7.9	63.2±1.2	60.8±1.9	66.8±8.5

【0097】これらの結果より、ほぼ濃度依存的に花芽形成誘導活性が増加し、中でも本発明ケトール脂肪酸

（I）の含量がノルエピネフリンと等モル濃度か、それ以上に高いC及びF実験群では、ノルエピネフリンが30nMという極低濃度でも花芽形成誘導活性があらわれることが明らかになった。すなわち、本発明ケトール脂肪酸（I）の含量がノルエピネフリンと等モル濃度である場合において、所望するアオウキクサにおける花芽形成誘導活性が最も効率的に発揮されることが明らかになった。

【0098】このように、上記濃度で本発明ケトール脂肪酸（I）とノルエピネフリンとを組み合わせる投与することによる、アオウキクサにおける花芽形成誘導活性が認められた。なお、後述するように、アオウキクサと全く異なる系統の双子葉植物であるアサガオにおいても、本発明ケトール脂肪酸（I）等による花芽形成誘導活性が認められることから、ウキクサ属植物及びアオウキクサ属植物を含むうきくさ科植物において花芽形成誘導活性が認められることは明らかである。

【0099】上記試験例A1において用いた、抽出法で製造した本発明関連ケトール脂肪酸（I）の代わりに、前述の③化学合成法で製造した本発明関連ケトール脂肪酸（I）を用いて、上記試験例A1と同じ試験系で花芽形成誘導促進試験を行った結果、上記試験例A1の結果と同一性のある結果が得られた。

【0100】〔試験例A2〕本発明関連ケトール脂肪酸（I）のアサガオに対する花芽形成誘導作用の検討（1）

9gのアサガオ（品種名：ムラサキ）の種子に濃硫酸処理を20分間施し、その後流水下で一晩放置した。次いで、種子のへその部分を上にして、湿った海砂上に24時間置いて、発根させた。これらの発根した種子を海砂中に、1.5～2.0cm程度の深さに植え、連続光下で培養した（5日間程度）。

【0101】この培養により開葉したアサガオの全植物体を、培養液（KNO₃（250mg）、NH₄NO₃（250mg）、KH₂PO₄（250

＊花成率を求めた（第2表）。なお、同一の系における試験は、それぞれ3フラスコで行い、かつ最低2回同一の系の試験を行った。第2表に示した結果は、それぞれの試験の平均値±SE（標準誤差）である。

【0096】

【表2】

mg）、MgSO₄・7H₂O（250mg）、MnSO₄・4H₂O（1mg）、Fe-citrate n-hydrate（6mg）、H₃BO₃（2mg）、CuSO₄・5H₂O（0.1mg）、ZnSO₄・7H₂O（0.2mg）、Na₂MoO₄・2H₂O（0.2mg）、Ca（H₂PO₄）₂・2H₂O（250mg）／1000ml蒸留水〕に移した。この培養系に上記製造例において得た本発明関連ケトール脂肪酸（I）等の被験薬物を木綿糸を用いて、直接アサガオの導管に投与しながら暗処理を行い、その後28℃で16日間連続光で育成し、16日目の花芽の数を実体顕微鏡で観察確認した。

【0102】暗処理は、1晩（16時間の暗処理）又は2晩（16時間の暗処理＋8時間の明処理＋16時間の暗処理）を行った。1晩処理を行った結果を第2図に示す。また、2晩処理を行った結果を第3図に示す。両図において、対照群は蒸留水を投与した群であり、1μM（αI）、10μM（αI）、100μM（αI）は、それぞれの濃度の本発明関連ケトール脂肪酸（I）を投与した群であり、NE＋αIは、ノルエピネフリン10μMを試験例A1に記載した方法で乾燥ストレスをかけたアオウキクサのP441系統の浸漬水とインキュベーションしたものである。

【0103】第2図に示した1晩暗処理群では対照群との比較において、本発明関連ケトール脂肪酸（I）の花芽誘導活性が認められたが、それ以上にノルエピネフリンと組み合わせる投与した群に強い花芽誘導活性が認められた。これに対して、第3図に示した2晩暗処理群では、対照群や投与した薬剤の濃度の違いについて着目すると、平均花芽数が濃度依存的に増加し、少なくとも花芽誘導活性を増強していることが認められた。このようにして、アサガオにおける本発明関連ケトール脂肪酸（I）等の花芽誘導活性が認められた。

【0104】上記試験例A2において用いた、抽出法で製造した本発明関連ケトール脂肪酸（I）の代わりに、前述の②酵素法、及び③化学合成法で製造した本発明関連ケトール脂肪酸（I）を用いて、上記試験例A2と同じ試験系で花芽形成誘導促進試験を行った結果、上記試験例A2の結果と同一性のある結果が得られた。

【0105】〔試験例A3〕 アサガオにおける本発明
関連ケトール脂肪酸（I）の花芽形成誘導作用の検討
（2）

上記試験例の結果をさらに多くの対象（50個体）で検討して、アサガオにおける本発明関連ケトール脂肪酸（I）の効果についてさらに検討した。すなわち前記試験例A2におけるアサガオ（品種名：ムラサキ）の培養系において、本発明関連ケトール脂肪酸（I）の被験水溶液（1.0 μ M, 10.0 μ M, 100.0 μ M 水溶液）を木綿糸を用いて、直接アサガオの導管に投与しながら暗処理を行い、その後28℃で16日間連続光で育成し、16日目の花芽の数を実体顕微鏡で観察確認した。なお、暗処理は1晩（16時間の暗処理）を行った。

【0106】その結果を第4図に示す。第4図において、対照群は蒸留水を投与した群であり、1 μ M, 10 μ M, 100 μ M は、それぞれの濃度の本発明関連ケトール脂肪酸（I）を投与した群である。第4図において明らかなように、少なくとも1.0 μ M の本発明関連ケトール脂肪酸（I）水溶液を投与することでアサガオの花芽形成が促進され、少なくとも10.0 μ M の本発明関連ケトール脂肪酸（I）水溶液の投与に至るまで、本発明関連ケトール脂肪酸（I）の濃度に依存して、その花芽形成誘導作用が向上することが認められた。また、100.0 μ M の本発明関連ケトール脂肪酸（I）水溶液の投与した群においては、本発明関連ケトール脂肪酸（I）の量が過剰であるために、かえって所望する花芽形成誘導作用が阻害される傾向にあることが示唆された。

【0107】上記試験例A3において用いた、抽出法で製造した本発明関連ケトール脂肪酸（I）の代わりに、前述の③化学合成法で製造した本発明関連ケトール脂肪酸（I）を用いて、上記試験例A3と同じ試験系で花芽形成誘導促進試験を行った結果、上記試験例A3の結果と同一性のある結果が得られた。

【0108】〔試験例A4〕 アサガオにおける本発明
関連ケトール脂肪酸（I）の花芽形成誘導作用の検討
（3）

本試験例では、本発明関連ケトール脂肪酸（I）の投与による花芽形成誘導作用が、暗処理時間によってどのように変化するかを検討した。本試験例の試験系は、個体数を除いて上記試験例A3と同様の試験系を用いた。ただし、本発明関連ケトール脂肪酸（I）の被験水溶液における濃度は、10.0 μ M に統一した。また、暗処理は1晩（14時間、16時間、18時間）行って、対照群と試験群における暗処理時間の花芽形成に対する影響を調べた。

【0109】その結果を第5図に示す。第5図において、nは試験に用いた個体数を示す。また、横軸はそれぞれの暗処理の時間である。第5図において明らかなよ

うに、1晩の暗処理群では少なくとも暗処理時間が18時間以内では暗処理時間の長さに対応して花芽形成が対照群、試験群共に促進されることが明らかになり、いずれの暗処理群においても本発明関連ケトール脂肪酸

（I）は、アサガオに対して花芽形成誘導作用を有することが明らかになった。

【0110】上記試験例A4において用いた、抽出法で製造した本発明関連ケトール脂肪酸（I）の代わりに、前述の②酵素法、及び③化学合成法で製造した本発明関連ケトール脂肪酸（I）を用いて、上記試験例A4と同じ試験系で花芽形成誘導促進試験を行った結果、上記試験例A4の結果と同一性のある結果が得られた。

【0111】〔試験例A5〕 アサガオにおける本発明
関連ケトール脂肪酸（I）の花芽形成誘導作用の検討
（4）

前記試験例A2に挙げた方法と同様の方法で発芽させたアサガオ（品種名：ムラサキ）を準備した。本発明関連ケトール脂肪酸（I）濃度が、1.0 μ M, 10.0 μ M 及び50.0 μ M の水溶液をそれぞれ調製した。これらの本発明関連ケトール脂肪酸（I）の水溶液を、暗処理をする直前と暗処理後10日間毎日、スプレーで双葉の表裏に吹きかけた。14日後の花芽の数（それぞれの群における32個体の平均）を求めた。

【0112】その結果を第6図に示す。第6図において明らかなように、少なくとも1.0 μ M の本発明関連ケトール脂肪酸（I）水溶液を噴霧することでアサガオの花芽形成が促進され、その後本発明関連ケトール脂肪酸（I）の用量に依存して花芽形成誘導作用のほぼ最大限が発揮されることが明らかになった。

【0113】上記試験例A5において用いた、抽出法で製造した本発明関連ケトール脂肪酸（I）の代わりに、前述の②酵素法、及び③化学合成法で製造した本発明関連ケトール脂肪酸（I）を用いて、上記試験例A5と同じ試験系で花芽形成誘導促進試験を行った結果、上記試験例A5の結果と同一性のある結果が得られた。

【0114】〔試験例A6〕 ラン科植物における本発明
関連ケトール脂肪酸（I）の花芽形成誘導作用の検討
（1）

デンドロビウム ハイブリダム レッドスター (*Dendrobium hybridum* Hort., Redstar) の鉢植え20鉢に、4月から7月にかけて油かす及び液体肥料（ハイボネクス）を適時に与えながら栽培した。施肥中止後、これらの株を実験区と対照区とに分けて、実験区の株には月曜日から金曜日の間（8月から12月末まで）の毎日、毎回50 μ M の本発明関連ケトール脂肪酸（I）の水溶液を、スプレーで株全体に散布して栽培を継続した。なお対照区の株には、本発明関連ケトール脂肪酸（I）の水溶液の代わりに水を同様に散布した。翌年から、開花時期と開花数を実験区及び対照区で、各々10鉢について観察した。なお、本試験例において用いたデンドロビ

ームは、温室に置き、冬期でも最低温度が10℃より低くならないように管理した。その結果を下記第3表に示す。

* 【0115】

【表3】

*

第 3 表

	開 花 時 期	1 株 当 り の 開 花 数 (相 対 値)
実 験 区	2 月 (7 鉢) , 3 月 (3 鉢)	1 3 2
対 照 区 (水)	3 月 (8 鉢) , 4 月 (2 鉢)	1 0 0

【0116】この結果より、明らかに本発明関連ケトール脂肪酸 (I) 水溶液の噴霧により、デンドロビュームの花芽形成が開花数においても、時期的にも促進されることが明らかになった。

【0117】上記試験例A6において用いた、抽出法で製造した本発明関連ケトール脂肪酸 (I) の代わりに、前述の②酵素法、及び③化学合成法で製造した本発明関連ケトール脂肪酸 (I) を用いて、上記試験例A6と同じ試験系で花芽形成誘導促進試験を行った結果、上記試験例A6の結果と同一性のある結果が得られた。

【0118】〔試験例A7〕ラン科植物における本発明関連ケトール脂肪酸 (I) の花芽形成誘導作用の検討 (2)

シンビジューム ハイブリダム ラズベリーミルフィーユ (*Cymbidium hybridum* Hort., *Raspberry Mille-feuille*) の鉢植え20鉢に、4月から8月にかけて油かす ※

※及び液体肥料 (ハイポネクス) を適時に与えながら栽培した。施肥中止後、これらの株を実験区と対照区とに分けて、実験区の株には月曜日から金曜日の間 (9月から11月末まで) の毎日、毎回50μMの本発明関連ケトール脂肪酸 (I) の水溶液を、7月から月曜日から金曜日の間、毎日50μMの本発明関連ケトール脂肪酸 (I) の水溶液を、スプレーで株全体に散布した。翌年から、開花時期と開花数を実験区及び本発明関連ケトール脂肪酸 (I) の水溶液の替わりに水を散布した対照区で、各々10鉢について観察した。本試験例において用いたシンビジュームは、温室に置き、冬期でも最低温度が10℃より低くならないように管理した。その結果を下記第4表に示す。

【0119】

【表4】

第 4 表

	開 花 時 期	1 株 当 り の 開 花 数 (相 対 値)
実 験 区	1 月 (1 鉢) , 2 月 (7 鉢) 3 月 (2 鉢)	1 5 1
対 照 区 (水)	3 月 (1 0 鉢)	1 0 0

【0120】この結果より、明らかに本発明関連ケトール脂肪酸 (I) 水溶液の噴霧により、シンビジュームの花芽形成が開花数においても、時期的にも促進されることが明らかになった。

【0121】上記試験例A7において用いた、抽出法で製造した本発明関連ケトール脂肪酸 (I) の代わりに、前述の②酵素法、及び③化学合成法で製造した本発明関連ケトール脂肪酸 (I) を用いて、上記試験例A7と同じ試験系で花芽形成誘導促進試験を行った結果、上記試験例A7の結果と同一性のある結果が得られた。

【0122】〔試験例A8〕カーネーションにおける本発明関連ケトール脂肪酸 (I) の花芽形成誘導作用の検討

カーネーション (*Dianthus caryophyllus* L.) の種を9月に蒔き、その翌年の3月に植え代えた。植え代えた後、月曜日から金曜日の間、毎日50μMの本発明関連ケトール脂肪酸 (I) の水溶液を、スプレーで株全体に散布した。その年の7月に、カーネーションの開花数を、実験区及び本発明関連ケトール脂肪酸 (I) の水溶

液の替わりに水を散布した対照区において、各々100株について計数した。その結果、実験区においては1株当りの開花数の相対値は、対照区を100として、142であった。

【0123】この結果より、明らかに本発明関連ケトール脂肪酸 (I) 水溶液の噴霧により、カーネーションの花芽形成が、その開花数において促進されることが明らかになった。

【0124】上記試験例A8において用いた、抽出法で製造した本発明関連ケトール脂肪酸 (I) の代わりに、前述の②酵素法、及び③化学合成法で製造した本発明関連ケトール脂肪酸 (I) を用いて、上記試験例A8と同じ試験系で花芽形成誘導促進試験を行った結果、上記試験例A8の結果と同一性のある結果が得られた。

【0125】〔試験例A9〕アスパラガスにおける本発明関連ケトール脂肪酸 (I) の花芽形成誘導作用の検討

FALCON 1007 型ディスポシャーレ (60mm×15mm, BECTON DICKINSON and Company) に濾紙 (ADVANTEC TOYO, No. 2)

を3枚敷き9mlの試験液〔コントロール(精製水)、200 μ M 本発明関連ケトール脂肪酸(I)〕を入れアスパラガス種子(Mary Washington 500W)を1シャーレ当たり25粒播き、25℃で暗所で8日間置き発芽させた。その際の発芽率はコントロールが90%で、200 μ M 本発明関連ケトール脂肪酸(I)が96%であった。その後、種子を水洗してバーミキュライトに移植し、12時間日長(人工気象器、日本医科器械製作所)25℃で14日間生育を行い、花芽のついた個体数を数えた。花芽形成率は、花芽のついた個体数/全個体数 \times 100

(%)で表した。その結果、コントロールに対しては花芽は全く形成されなかったのに対し、200 μ M 本発明関連ケトール脂肪酸(I)では、12.5%の個体に花芽が認められた。

【0126】この結果より、明らかに本発明関連ケトール脂肪酸(I)との接触により、カーネーションの花芽形成が促進されることが明らかになった。上記試験例A9において用いた、抽出法で製造した本発明関連ケトール脂肪酸(I)の代わりに、前述の②酵素法、及び③化学合成法で製造した本発明関連ケトール脂肪酸(I)を用いて、上記試験例A9と同じ試験系で花芽形成誘導促進試験を行った結果、上記試験例A9の結果と同一性のある結果が得られた。

【0127】食用アスパラガス(*Asparagus officinalis*)は、前記した单子葉植物であるユリ科(Liliaceae)に属する雌雄異株の多年生植物である。アスパラガスは、種子繁殖による雌雄の出現率はほぼ1:1であるが、雄株が雌株に比べて食用とする若茎の生産能力が高く、また早生である等の農業上の有益性から雄株の大量増殖が望まれている。しかし、雌雄の判定は播種後2~3年を経た開花期の花器の形態によってのみ可能であることから、早期の雌雄判定法の確立が待たれている。これまで、トリアジン型光合成阻害除草剤であるアントラジン及びウレア型除草剤のDCMUが僅か1ヵ月の実生に高率で花芽を誘導することが報告されている(T. Abe, and T. Kameya, *Planta*, 169, 289(1986))。

【0128】しかしながら、これらの除草剤で処理したアスパラガスは、播種の2ヵ月後に薬剤の殺草作用により、その植物体の70%が枯死することも同時に報告されている。そこで、現在アスパラガスの花芽を誘導し、かつ枯死させることのない薬剤の探索が行われている。上記試験例A9により、本発明関連ケトール脂肪酸(I)にアスパラガスの花芽を形成する活性が認められたことから、本発明関連ケトール脂肪酸(I)はこのアスパラガスにおいて求められている「花芽を形成し、しかもその使用によりアスパラガスを枯死させることがない」という課題を解決し得る成分であることが明らかになった。

【0129】B. 酵素法により得た本発明関連ケトール脂肪酸(I)における検討

【製造例B】

1. コメ胚芽由来のリボキシゲナーゼの調製

コメヌカ350gを石油エーテルで洗浄、脱脂及び乾燥したもの(250g)を、0.1M・pH4.5の酢酸緩衝液1.25lに懸濁し、この懸濁物をホモジナイズした。次いで、かかるホモジナイズ抽出液を16000rpmで15分間遠心分離し、上清(0.8l)を得た。得られた上清に硫酸アンモニウム140.8g(0~30%飽和)を加え、4℃で一晩硫酸沈澱を行った。その後、9500rpmで30分間遠心を行い、得られた上清(0.85l)に硫酸アンモニウム232g(30~70%飽和)を添加して、4℃で5時間放置した。

【0130】次に、同様に9500rpmで30分間遠心を行い、これにより得られた沈澱物(コメヌカ抽出液の硫酸30~70%飽和画分)をpH4.5の酢酸緩衝液300mlに溶解し、63℃で5分間加熱処理を行った。その後、生成した沈澱物を除去して、得られた上清に硫酸アンモニウム120.8g(0~70%飽和)を添加して、4℃で一晩硫酸沈澱を行った。次いで、9000rpmで30分間遠心し、得られた沈澱物を0.1M・pH4.5の酢酸緩衝液300mlに溶解し、RC透析チューブ(Spectrum社製ポア4:MWCO 12000~14000)を用いて透析(31 \times 3)後、脱塩して、所望するコメ胚芽由来のリボキシゲナーゼの粗酵素液を得た。

【0131】2. アマ種子由来のアレンオキサイドシンターゼの調製

アマ種子は一丸ファルコスから購入した。このアマ種子200gに、アセトン250mlを添加してホモジナイズ(20s \times 3)し、得られた沈澱物を目皿ロートで濾取し、溶媒を除去した。次いで、沈澱物を再びアセトン250mlに懸濁してホモジナイズ(10s \times 3)し、沈澱物を得た。沈澱物をアセトン及びエチルエーテルで洗浄後、乾燥して、アマ種子のアセトン性粉を得た(150g)。

【0132】このアマ種子のアセトン性粉を、氷冷下50mMリン酸緩衝液(pH7.0)400mlに懸濁し、これを0℃で1時間スターラー攪拌を施して抽出した。得られた抽出物に11000rpmで30分間遠心し、これにより得られた上清(380ml)に硫酸アンモニウム105.3g(0~45%飽和)を加え、氷冷下で1時間沈澱し、さらに17000rpmで30分間遠心して得られた沈澱物を、50mMリン酸緩衝液(pH7.0)150mlに溶解し、透析して脱塩(31 \times 3)、所望するアマ種子由来のアレンオキサイドシンターゼの粗酵素液を得た。

【0133】3. α -リノレン酸のナトリウム塩の調製
出発原料とする α -リノレン酸は、水における溶解性が著しく低いので、酵素基質として働くことを容易にするために、 α -リノレン酸をナトリウム塩化した。すなわち、炭酸ナトリウム530mgを、精製水10mlに溶解し

10

20

30

40

50

て55℃に加温し、これに α -リノレン酸（ナカライテスク社）を278mg滴下して、3時間攪拌した。反応終了後、Dawex50wxk(H⁺ form)（ダウケミカル社製）で中和すると、沈澱物が生成した。これを濾過して樹脂を除き、MeOHで洗浄後、減圧下で溶媒を留去した。これにより得られた生成物をイソプロパノールで再結晶し、所望する α -リノレン酸のナトリウム塩（1250mg, 83%）を得た。

【0134】4. 本発明関連ケトール脂肪酸（I）の製造

上記3により得られた α -リノレン酸のナトリウム塩（15mg:50 μ mol）を、0.1Mのリン酸緩衝液（pH7.0）30mlに溶解した。次いで、この溶液に、酸素気流下、25℃で上記1により得たコメ胚芽由来のリポキシゲナーゼの粗酵素液を3.18ml添加した後、30分間攪拌した後、さらに同じくコメ胚芽由来のリポキシゲナーゼの粗酵素液を3.18mlを添加して、30分間攪拌した。この攪拌終了後、このリポキシゲナーゼ反応物に、窒素気流下で上記2で得たアレンオキサイドシンターゼの粗酵素液を34.5ml添加して、1時間攪拌した後、氷冷下希塩酸を添加して、反応溶液のpHを3.0に調整した。

【0135】次いで、反応液をCHCl₃-MeOH=10:1で抽出した。得られた抽出液を水洗後、硫酸マ*

*グネシウムで乾燥し、酢酸0.1mlを加え、減圧下、溶媒を留去して乾燥した。このようにして得られた粗生成物をあらためてHPLCにかけて、その本発明関連ケトール脂肪酸（I）と認められるピーク（リテンションタイム：16分付近）を分取した。分取した画分にクロロホルムを加え、クロロホルム層を分離して水洗し、エバポレーターでこのクロロホルムを留去して、精製物を得た。

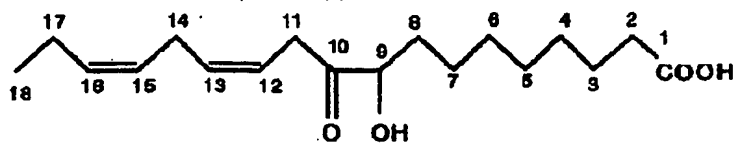
【0136】この精製物の構造を確認するために重メタノール溶液で¹H、及び¹³C-NMRスペクトルを測定した。その結果、¹H-NMRにおいて、末端メチル基〔 δ 0.98(t)〕、2組のオレフィン〔（ δ 5.25, 5.40）,（ δ 5.55, 5.62）〕、2級水酸基〔 δ 4.09(dd)〕及び多数のメチレンに基づくシグナルが認められ、本発明関連ケトール脂肪酸（I）と同一化合物と推定された。

【0137】さらに、¹³C-NMRのケミカルシフト値を比較したところ、本発明関連ケトール脂肪酸（I）〔上記抽出法により製造された標品〕と一致した（第5表参照のこと）。よって、上記のようにして得た酵素法による合成品は、確かに本発明関連ケトール脂肪酸（I）であることが明らかになった。

【0138】

【表5】

第 5 表



	標 品	酵素法による合成品
C-1	178.5	178.4
C-2	35.7	35.4
C-3	26.8*	26.9*
C-4	31.1**	31.1**
C-5	31.0**	31.0**
C-6	31.1**	31.1**
C-7	26.9*	26.9*
C-8	35.4	35.4
C-9	78.6	78.6
C-10	213.8	213.8
C-11	38.4	38.4
C-12	123.0	123.0
C-13	133.5	133.4
C-14	27.5	27.5
C-15	128.4	128.4
C-16	134.6	134.0
C-17	22.3	22.3
C-18	15.4	15.4

*, ** 帰属不明

【0139】〔試験例B1〕本発明関連ケトール脂肪酸 (I) (酵素法による合成品) のアオウキクサに対する花形成誘導作用の検討

上記製造例Bにおいて得られた本発明関連ケトール脂肪酸 (I) の花芽形成誘導作用を、前述の「P151」をモデル植物として、その花成率 (%) (花成が認められた葉状体数/全体の葉状体数×100) で検討した。

【0140】すなわち、まず酵素法により得た、上記の本発明関連ケトール脂肪酸 (I) 0.155mgを0.15mlの水に溶解して、そこに10mMのノルエピネフリン 50μlと0.5Mのトリスバッファー (pH8.0) 25μlを加えた。その溶液を25℃で6時間インキュベートした。次に、この酵素法により得られた本発明関連ケトール脂肪酸 (I) とノルエピネフリンの濃度を第6表 (表の濃度表示は等量配合した本発明関連ケトール脂肪酸 (I) とノルエピネフリンの濃度を表示する) に示した濃度となるように、上の条件でインキュベートした溶液を、30mlフラスコ中のアッセイ培地 (1/10 E培地+1μmベンジルアデニン、シュクロースは添加せず) 10ml中に添加した。

【0141】これらの酵素法により得られた本発明関連ケトール脂肪酸 (I) を、各濃度添加したアッセイ培地上に、P151のコロニーを1つ植えて、24~25℃で昼光色蛍光灯で継続的に照射を行ないながら (Hitachi FL20 SSDで植物に対して約5W/m²の割合で照射) 7日間培養して、上記花成率を求めた (第6表)。なお、同一の系における試験は、それぞれ3フラスコで行い、かつ最低2回同一の系の試験を行った。第6表に示した結果は、それぞれの試験の平均値±SE (標準誤差) である。

【0142】第 6 表

濃 度	花芽誘導活性
1. 0 μM	50. 5 ± 6. 7
0. 3 μM	17. 7 ± 4. 7
0. 1 μM	0. 8 ± 0. 8

この第6表の結果より、酵素法で製造した本発明関連ケトール脂肪酸 (I) も、優れた花芽誘導活性を示すこと

が明らかになった。

【0143】〔試験例B2〕 アサガオにおける酵素法により製造した本発明関連ケトール脂肪酸（I）の花芽形成誘導作用の検討

前記試験例A2におけるアサガオ（品種名：ムラサキ）の培養系において、上記製造例Bで得た本発明関連ケトール脂肪酸（I）の被験水溶液（1.0 μ M, 10.0 μ M, 100.0 μ M 水溶液）を木綿糸を用いて、直接アサガオの導管に投与しながら暗処理を行い、その後28℃で16日間連続光で育成し、16日目の花芽の数を実体顕微鏡で観察確認した。なお、暗処理は1晩（16時間の暗処理）を行った。

【0144】その結果を第7図に示す。第7図において、対照群は蒸留水を投与した群であり、1 μ M, 10 μ M, 100 μ M は、それぞれの濃度の上記酵素法により製造した本発明関連ケトール脂肪酸（I）を投与した群である。第7図において明らかなように、少なくとも1.0 μ M の酵素法で製造した本発明関連ケトール脂肪酸（I）水溶液を投与することでアサガオの花芽形成が促進され、少なくとも10.0 μ M の同本発明関連ケトール脂肪酸（I）水溶液の投与に至るまで、同本発明関連ケトール脂肪酸（I）の濃度に依存して、その花芽形成誘導作用が向上することが認められた。また、100.0 μ M の酵素法で製造した本発明関連ケトール脂肪酸（I）水溶液の投与した群においては、同本発明関連ケトール脂肪酸（I）の量が過剰であるために、かえって所望する花芽形成誘導作用が阻害される傾向にあることが示唆された。これらの結果は、上述の抽出法で得た本発明関連ケトール脂肪酸（I）に関する試験例A3との同一性が認められた。

【0145】〔試験例C1〕 アサガオにおけるヒドロペルオキシ不飽和脂肪酸の花芽形成誘導作用の検討
上述の②酵素法に従って製造した、a) 9-ヒドロペルオキシ-10 (E), 12 (Z), 15 (Z)-オクタデカトリエン酸、及びb) 13-ヒドロペルオキシ-9 (Z), 11 (E), 15 (Z)-オクタデカトリエン酸のアサガオにおける花芽形成誘導作用を検討した。

【0146】この試験は、上記試験例A1における方法に準じて行った。すなわち、9gのアサガオ（品種名：ムラサキ）の種子に濃硫酸処理を20分間施し、その後流水下で一晩放置した。次いで、種子のへその部分を上にし、湿った海砂上に24時間置いて、発根させた。これらの発根した種子を海砂中に、1.5~2.0cm程度の深さに植え、連続光下で培養した（5日間程度）。

【0147】この培養により開葉したアサガオの全植物体を、培養液〔KNO₃ (250mg), NH₄NO₃ (250mg), KH₂PO₄ (250mg), MgSO₄ · 7H₂O (250mg), MnSO₄ · 4H₂O (1mg), Fe-citrate n-hydrate (6mg), H₃BO₃ (2mg), CuSO₄ · 5H₂O (0.1mg), ZeSO₄ · 7H₂O (0.2mg), Na₂MoO₄ · 2H₂O (0.2mg), Ca (H₂PO₄)₂ · 2H₂O (250mg) / 1000ml 蒸留水〕に移した。この培養系に上

記のヒドロペルオキシ不飽和脂肪酸である、a)及びb)を木綿糸を用いて、直接アサガオの導管に投与しながら暗処理を行い、その後28℃で14日間連続光で育成し、14日目の花芽の数を実体顕微鏡で観察確認した。なお、この試験は、一群16個体のアサガオを用いて行った。

【0148】暗処理は、1晩（16時間の暗処理）を行った。この結果を、下記第5表〔ヒドロペルオキシ不飽和脂肪酸a)における結果〕及び第7表〔ヒドロペルオキシ不飽和脂肪酸b)における結果〕に示す。

【0149】

【表6】

第7表

試験系	14日後の花芽の数
対照（水）	0.892
10.0 μ M	1.425
50.0 μ M	1.623
100.0 μ M	2.209

n = 16の平均

【0150】

【表7】

第8表

試験系	14日後の花芽の数
対照（水）	1.203
10.0 μ M	1.392
50.0 μ M	1.572
100.0 μ M	1.704

n = 16の平均

【0151】この試験例C1より、上記の本発明関連ケトール脂肪酸（I）と同様に、その代謝中間体として位置付けられるヒドロペルオキシ不飽和脂肪酸にも、花芽形成誘導作用が認められることが判明した。

【0152】上述の全試験例の結果より、少なくとも双子葉植物であるアサガオ等のアサガオ属植物が含まれるヒルガオ科植物及びカーネーション等のナデシコ属植物が含まれる、なでしこ科植物、並びに単子葉植物であるデンドロビューム属植物、シンビジューム属植物等が含まれる、らん科植物、ウキクサ属植物（ウキクサ）、アオウキクサ属植物（アオウキクサ、ヒンジモ）が含まれる、うきくさ科植物、アスパラガスが含まれる、ゆり科植物において、本発明関連ケトール脂肪酸（I）等による花芽形成誘導活性が認められることが明らかになった。

【0153】また、このように単子葉植物及び双子葉植

物間で、本発明関連ケトール脂肪酸（I）の花芽形成誘導作用が認められたことから、少なくとも本発明関連ケトール脂肪酸（I）は、植物の科間、属間乃至種間を超えて、広く植物全般において花芽形成誘導活性を発揮し得ることは、明らかである。

【0154】また、さらに本発明関連ケトール脂肪酸（I）の代謝中間体と考えられるヒドロペルオキシ不飽和脂肪酸においても、本発明関連ケトール脂肪酸（I）と同様にアサガオにおいて花芽形成誘導作用が認められたことから、本発明関連ケトール脂肪酸（I）と同様に、上記ヒドロペルオキシ不飽和脂肪酸も植物の科間、属間乃至種間を超えて、広く植物全般において花芽形成誘導活性を発揮することが明らかになった。

【0155】

【発明の効果】本発明により、植物の花芽形成に直接作用する花芽形成誘導剤及び花芽形成誘導用キットが提供される。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明関連ケトール脂肪酸（I）を示す¹³C-NMRのチャート図面である。

*【図2】1晩の暗処理を行った場合の本発明関連ケトール脂肪酸（I）を導管投与した場合のアサガオに対する花芽形成誘導作用を検討した図面である。

【図3】2晩の暗処理を行った場合の本発明関連ケトール脂肪酸（I）を導管投与した場合のアサガオに対する花芽形成誘導作用を検討した図面である。

【図4】1晩の暗処理を行った場合の本発明関連ケトール脂肪酸（I）を導管投与した場合のアサガオに対する花芽形成誘導作用を個体数を増やして検討した図面である。

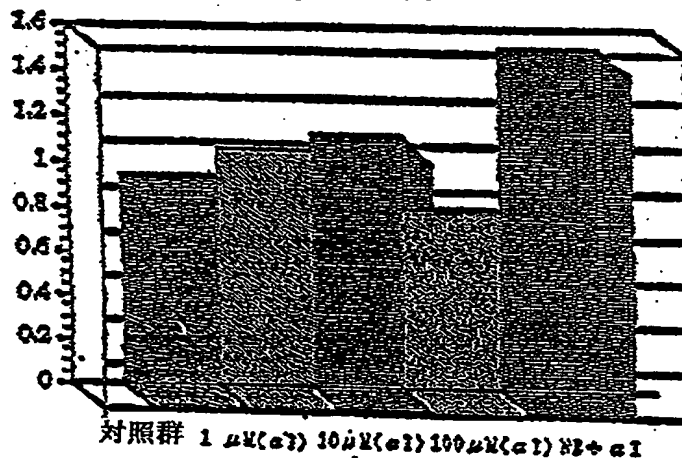
【図5】暗処理の長さとは本発明関連ケトール脂肪酸（I）の花芽形成誘導作用との関係を検討した図面である。

【図6】2晩の暗処理を行った場合の本発明関連ケトール脂肪酸（I）を散布投与した場合のアサガオに対する花芽形成誘導作用を検討した図面である。

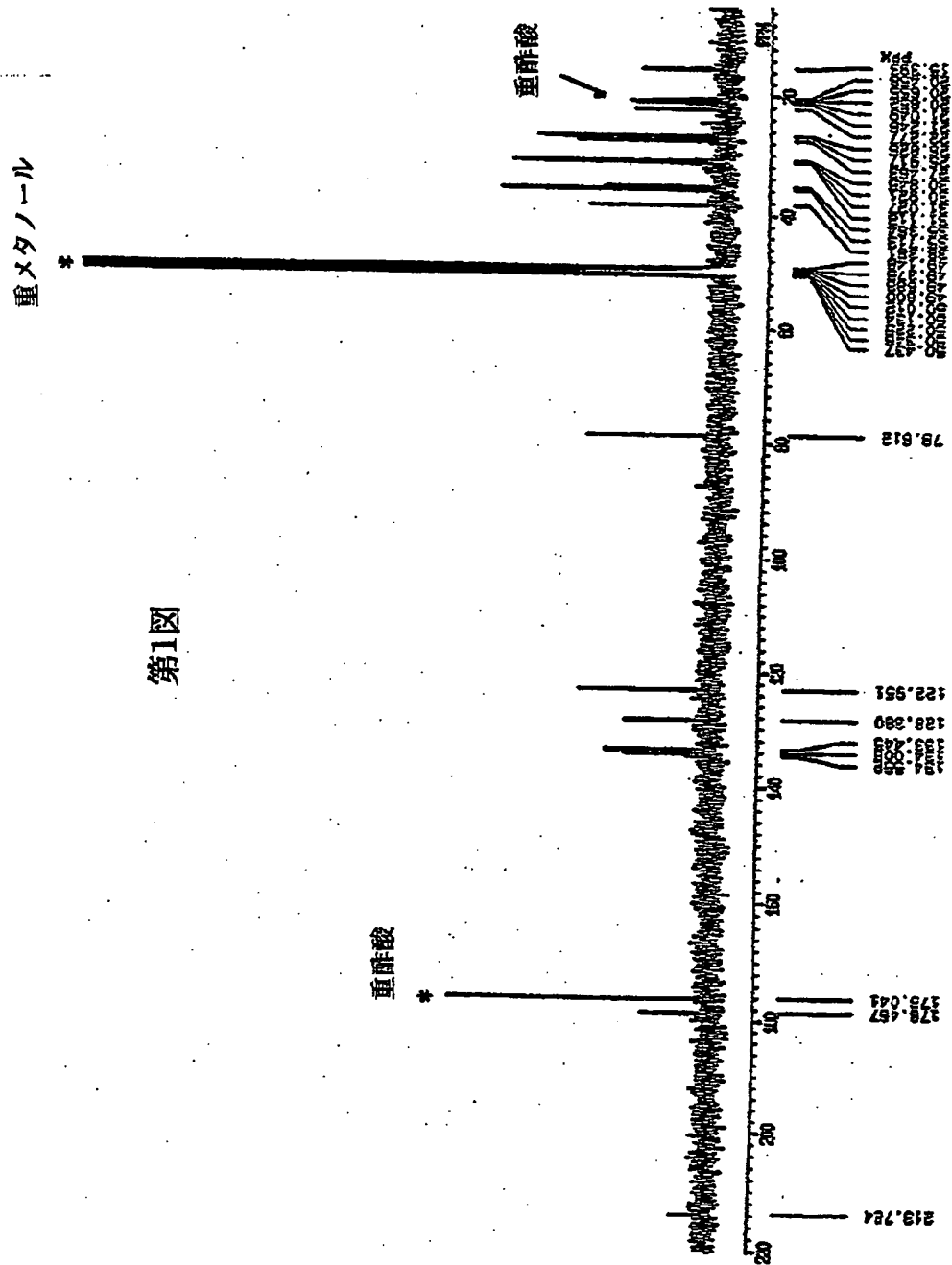
【図7】1晩の暗処理を行った場合の酵素法により製造した本発明関連ケトール脂肪酸（I）を導管投与した場合のアサガオに対する花芽形成誘導作用を個体数を増やして検討した図面である。

【図2】

第 2 図

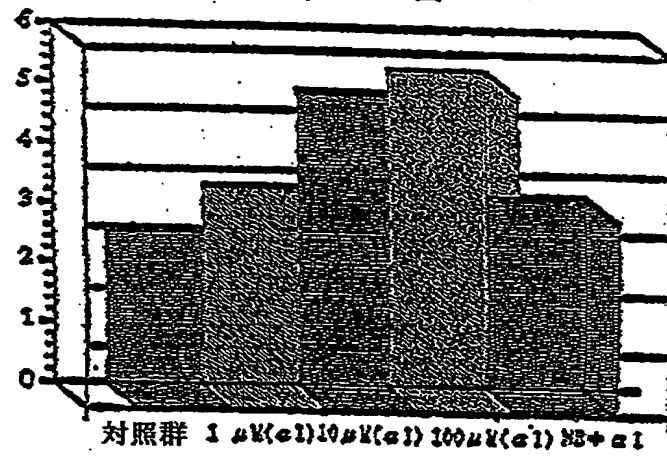


【図1】



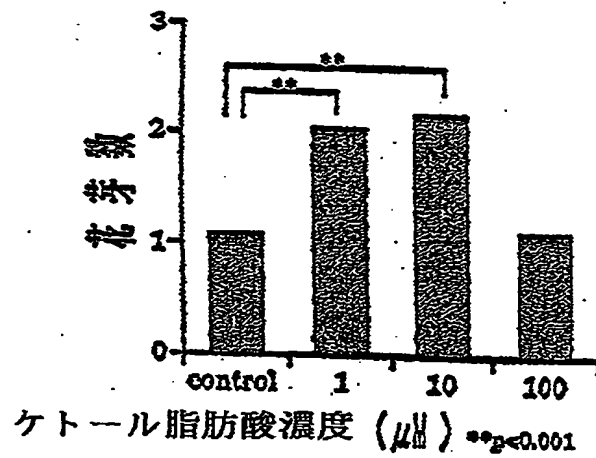
【図3】

第 3 図



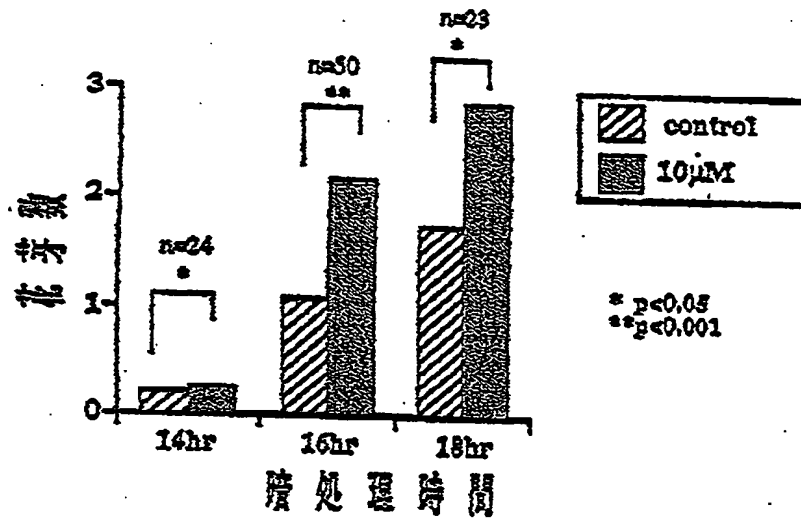
【図4】

第 4 図



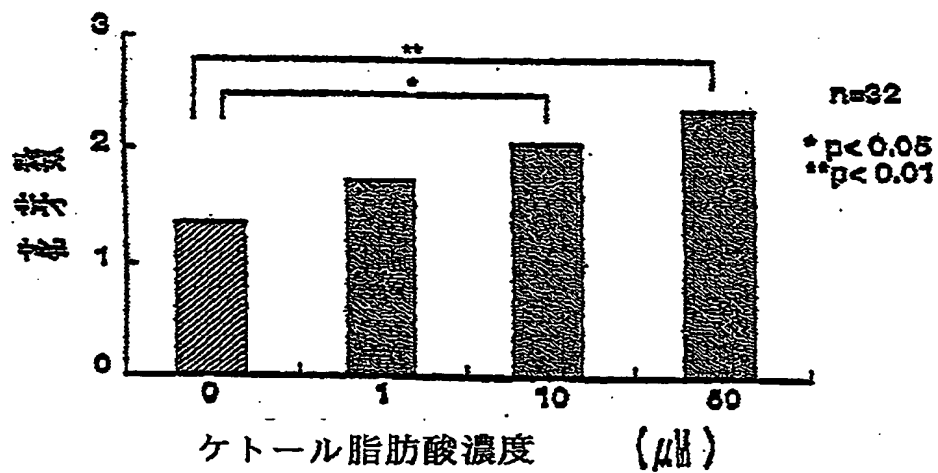
【図5】

第5図



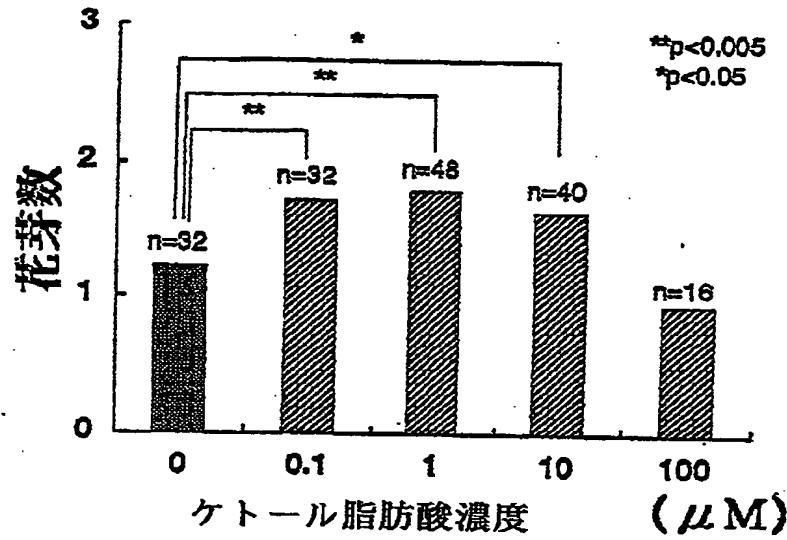
【図6】

第6図



【図7】

第7図



フロントページの続き

(72)発明者 小島 清隆
神奈川県横浜市港北区新羽町1050番地 株
式会社資生堂第1リサーチセンター内

(72)発明者 福井 寛
神奈川県横浜市港北区新羽町1050番地 株
式会社資生堂第1リサーチセンター内